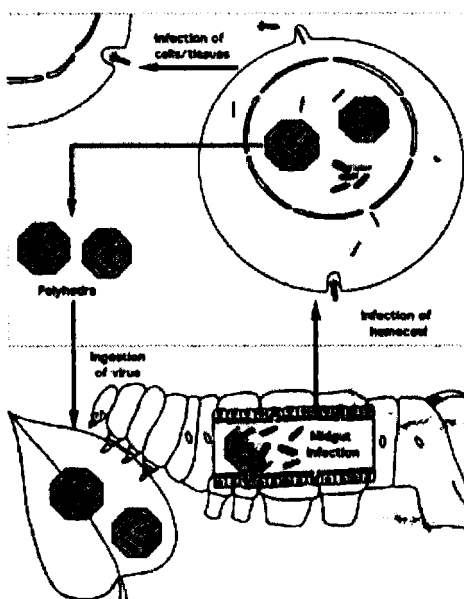




**Virus de la granulosis de *Epinotia aporema*
(barrenador de los brotes de la soja)**

**Identificación y estudio biológico-molecular de un
gen homólogo a la ecdisona glucosil transferasa (*egt*)**



Tesis Doctoral

María Alejandra Manzán

2002



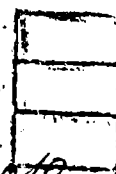
Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
UNLP

DEPOSICION.....



Fecha. 25-04-03

Inscripción..... 57010



El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección del Profesor Dr. Victor Romanowski.

*A mi familia, porque les debo lo que soy,
con todo el amor que puedo dar.*

Mi reconocimiento:

Al Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) y a la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme brindado el ámbito propicio para desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de las becas que posibilitaron mi dedicación exclusiva a la investigación científica.

Mi agradecimiento:

A mis padres, porque siempre intentaron (y lograron) que me sintiera libre y porque me apoyaron en cada "cosa" que quise hacer. A mis hermanos, que me han hecho sentir querida, me han soportado y ayudado tanto tanto, que sin ellos...este trabajo tampoco sería posible, especialmente a Andrea y Gabriela que viven conmigo. A mis sobrinos, porque son una fuente muy grande de amor y diversión.

Al Prof. Dr. Victor Romanowski, por dirigir mi trabajo, por su estímulo, criticismo y principalmente, por brindarme su apoyo y confianza.

A la Ingeniera Alicia Sciocco de Cap, porque con su esforzada y valiosa colaboración hizo que este trabajo fuera posible.

A la Dra. Daniela F. Hozbor, por su gran voluntad, por su optimismo, su estímulo permanente y su apoyo intelectual-emocional en todos los momentos en que lo necesité.

A los Dres, Mario Aguilar, Gabriel Favelukes, Daniel Ghiringhelli, Maria L. García, DanielGrasso, Oscar Grau, Antonio Lagares y Aníbal Lodeiro por sus valiosos consejos.

A mis compañera/os del laboratorio de VJ, Alina, Eloisa, Diego, Cristina, Marina y Agustín y a los que se fueron o vienen menos, Ramiro, Adriana, Alejandra, César, Alejo, Mario y Daniel. A todos ellos...gracias por comprender... y ayudarme.

A mis compañeros del IBBM, que empezaron siendo "nuevos conocidos amistosos" y se transformaron con los años en "viejos amistosos": Augusto Picho, Cecilia, Cecilia, Eduardo, Florencia, Gonzalo, Ignacio, Juan Carlos, Julia, Julieta y Fede, Katy, Laura Balagué, Laura Garcia, Mariano, Mónica, Omar, Pablo, Pedro, Pity, Selma, Silvia, Tirso, Vanina, Verónica El Mujtar y Verónica López,

A mis amistades, las recientes y las mas viejas, por soportarme y acompañarme a lo largo de todos estos años, con todos los humores y con todos mis estados de ánimo.

Y en especial a todos aquellos que en este momento me estoy olvidando.....que deben ser muchos...porque últimamente ...hasta tengo canas y me olvido de todo...

Ahhh...y gracias a la vida que me ha dado tanto!!!!

Índice.

CAPÍTULO I	Introducción General	
	Evolución de la agricultura argentina en la segunda mitad del siglo XX	1
	Cultivo de soja	2
	Exportación e impacto en la economía argentina	3
	Soja transgénica	4
	Plagas de la Soja	7
	Control de plagas en soja	8
	Control de <i>Epinotia aporema</i> en soja	8
	Efectos de los insecticidas químicos usados para el control de <i>E. aporema</i> .	9
	<i>Epinotia aporema</i> “barrenador de los brotes de soja”	10
	Ciclo de Vida y Morfología	11
	Manejo Integrado de Plagas	13
	Control Biológico	13
	Patología de Insectos	15
	Propiedades de los Entomopatógenos	16
	Baculovirus – Virus Entomopatógenos	17
	Características de la Familia Baculoviridae	17
	Estructura de la partícula viral	19
	Fenotipos del virión	19
	Cuerpos de oclusión	21
	Ciclo de Infección	22
	Infección Primaria	23
	Infección Secundaria	24
	Patogénesis	26
	Nucleopoliedrovirus	26
	Granulovirus	28
	Biología Molecular de los Baculovirus	30
	Expresión de genes tempranos	30
	Transición de la fase temprana a la tardía	31
	Interacciones Moleculares Virus – Huésped a nivel de organismo multicelular	34
	Baculovirus como biocontroladores de plagas agrícolas	36
	Baculovirus genéticamente modificados	37
	Granulovirus de <i>Epinotia aporema</i>	39
		40
OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS		
CAPÍTULO II	Bibliotecas Genómicas de EpapGV	
	Introducción	41
	Materiales y Métodos	44
	Resultados y Discusión	50
CAPÍTULO III	Estudio Biológico molecular del gen <i>egt</i>	
	Introducción	61
	Materiales y Métodos	73
	Resultados	83

CAPÍTULO IV	Desarrollo de un método de tipificación genómico para el control de calidad de la producción de EpapGV basado en la técnica de PCR	
	Introducción	99
	Materiales y Métodos	101
	Resultados y Discusión	106
CAPÍTULO V	Clonado y Análisis molecular del gen de la Helicasa de EpapGV	
	Introducción.	115
	Materiales y Métodos	117
	Resultados y Discusión	120
	CONCLUSIONES	128
	Perspectivas	131
	Bibliografía	132
	ANEXO I – Materiales y Métodos generales	140

Resumen

La capacidad de los baculovirus de producir epizootias y regular el tamaño de las poblaciones de insectos ha sido aprovechada para la sustitución de insecticidas tóxicos de amplio espectro en programas de manejo integrado de plagas. En tal sentido, numerosos baculovirus han sido desarrollados como bioinsecticidas y registrados para su comercialización.

Sin embargo, salvo ciertas excepciones, el uso de baculovirus como alternativa de control de plagas se ha enfrentado con una serie de inconvenientes. En primer lugar, en la mayoría de los países, su costo de producción es elevado en comparación con el de los insecticidas químicos. En segundo lugar, la velocidad de acción de los insecticidas virales es baja (4-8 días). Por último, la producción del virus sobre larvas del hospedador requiere de un estricto control de calidad tanto de la cría de insectos como del inóculo, factor que a menudo no ha sido tenido en cuenta. Parte de estas desventajas podrían solucionarse utilizando estrategias de modificación genética del genoma viral. Es con esta premisa que en el laboratorio se abordó la caracterización bioquímica y molecular de un aislamiento viral (EpapGV) obtenido en Oliveros (Santa Fe) con alta virulencia para el insecto plaga de la soja *Epinotia aporema* o "barrenador de los brotes".

Se construyó una genoteca del DNA viral de EpapGV que sentó las bases para los estudios posteriores relativos al análisis del papel que juegan los diferentes factores virales en la patogenicidad en *E. aporema*. Específicamente se ha estudiado al gen *egt* y a su producto ecdisona glicosil transferasa (EGT). La elección de este gen se basó fundamentalmente en dos aspectos: la observación de un retraso en la muda de la larva de *E. aporema* infectada con EpapGV y la similitud de estas observaciones con otras informadas para infecciones virales producidas por NPVs, las cuales han sido asociadas a la presencia del gen *egt*. Los resultados obtenidos a partir de estos estudios permitieron determinar que el gen *egt* de EpapGV se encuentra bajo la acción de un promotor temprano y que su producto de expresión efectivamente modifica a la hormona ecdisona.

Asimismo, se inició el estudio del gen de *helicasa* relacionado con la especificidad de rango de huéspedes. Se encontraron dos genes, *helicasa I* y *II*. Se pudo detectar que Helicasa I posee motivos asociados a su función de desenrollamiento sobre el DNA mientras que Helicasa II posee motivos AAA-ATPasa, encontrados en la super familia 1 de las RNA helicasas virales, asociados al mantenimiento de múltiples funciones celulares.

Finalmente se desarrolló un método de control de calidad de los *stocks* virales que formarán parte de la formulación del bioinsecticida. Se desarrolló un método de *multiplex* PCR que permite identificar a EpapGV en formulados bioinsecticidas de manera específica y sensible. Los patrones obtenidos para este virus pueden diferenciarse de los obtenidos para un granulovirus (CpGV) y un poliedrovirus (AgMNPV).

Los resultados alcanzados sobre caracterización de EpapGV contribuyeron al conocimiento de la interacción insecto-patógeno y aportaron información básica de importancia en el futuro diseño de estrategias de mejoramiento genético del virus. Además, el desarrollo de las técnicas moleculares aplicadas en el control de calidad complementa los requisitos imprescindibles para el registro del virus como insecticida biológico.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

El propósito de esta introducción general, es dar una visión integrada de los aspectos relacionados con el fundamento de esta tesis. El tema específico de este trabajo de investigación se encuentra incluido en un proyecto de transferencia tecnológica llamado **Caracterización de un virus de la granulosis y desarrollo de un insecticida para el control biológico de *Epinotia aporema***. En este sentido, se hace necesario comentar factores relativos al control de plagas, el uso de bioinsecticidas y su relación con el tema de tesis al inicio del proyecto.

En principio, describiré la evolución de la agricultura argentina y los factores que la afectan; el cultivo de soja, su evolución en el país, las plagas que lo perjudican y su control, haciendo énfasis en ***Epinotia aporema*** (plaga específica que nos interesa controlar). Luego comentaré las alternativas posibles de tratamiento de éste insecto dentro de un esquema de manejo integrado de plagas. Para finalizar describiré la familia *Baculoviridae*, a la que pertenece el virus propuesto como agente para el control biológico de *E. aporema*.

Evolución de la agricultura argentina en la segunda mitad del siglo XX

Argentina con 2.791.810 km² (sin incluir la superficie extracontinental), ocupa el séptimo lugar en el mundo por su extensión territorial. Posee varios tipos de suelos de llanura extremadamente fértiles, siendo la región pampeana una de las seis regiones potencialmente más agro-productivas de todo el mundo. Sobre esta base, Argentina se ha convertido en lo que muchos han dado en llamar “el granero del mundo”.

A fines de la década del cuarenta y sobre todo en los años cincuenta, el estilo de producción dominante era la aplicación de la agricultura continua, esto provocó el deterioro y degradación de los suelos, que se reflejó en una disminución en la producción unitaria de granos de maíz de 5 a 2,5 toneladas/ha, con un incremento importante en los costos de producción. Esta preocupante situación promovió el desarrollo de nuevas alternativas tecnológicas y nuevas formas de manejo de la agricultura, encaminadas a evitar el deterioro del suelo y la pérdida de su productividad.

De esta manera se produjo un cambio hacia una nueva agricultura cuyas principales características fueron:

1. Incremento de la frontera agropecuaria, usada específicamente en agricultura.
2. **Fomento de producción de cultivos no tradicionales (soja, girasol, colza, etc.).**

3. **Aumento de la capacidad de uso de la maquinaria agrícola e implementación de la siembra directa [práctica cultural en la cual no existe la roturación del suelo].**
4. **Mayor intensificación en el uso de herbicidas e insecticidas.**
5. Incremento sustancial del ciclo agrícola para obtener mayor número de cosechas (tres cosechas cada dos años).

Entre todos los factores mencionados, el aumento más impactante fue el de la implementación del cultivo de la soja (al cuál se hará especial referencia luego) y de la tecnología de siembra directa. Si bien es cierto que la siembra directa ha permitido disminuir o, por lo menos, desacelerar los procesos de erosión, la misma se ha llevado adelante generando cambios sustanciales en el ecosistema, como la aparición de nuevas enfermedades e insectos plaga, el incremento de la contaminación ambiental y la aparición de resistencia en malezas e insectos a los productos utilizados para su control. En particular, si bien la siembra directa surgió como alternativa conservacionista, ésta se encuentra apoyada muy fuertemente en el control químico y por ende no puede considerarse una práctica sustentable (Pengue, 2000).

Cultivo de soja

La soja salvaje (*Glicine max*) crecía principalmente en tierras húmedas y fue introducida al mercado doméstico, hace ya más de cinco mil años, por los agricultores del sur de China. Dos mil años más tarde, el cultivo de esta leguminosa se extendió al resto de Asia y recién al inicio del siglo XX comenzó a ser cultivada y comercializada en los EE.UU. A partir de entonces, ha habido un rápido crecimiento en la producción con el desarrollo de los primeros cultivares comerciales.

En Argentina las primeras plantaciones de soja se hicieron en 1862, pero no encontraron eco en el campo argentino. En 1909 el cultivo de la soja comenzó a ensayarse en distintas escuelas agrícolas argentinas. Desde 1965, en las estaciones agroexperimentales del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), se intensificaron los trabajos de investigación sobre su adaptabilidad y rendimiento en suelo argentino. Si bien los resultados de los ensayos realizados fueron buenos, el cultivo no logró mayor difusión entre los productores hasta la década del 70, cuando Argentina comenzó a producir la soja en forma competitiva.

En un principio, el aumento del área sembrada, la producción y los rendimientos estaban asociados a técnicas culturales y el uso de variedades introducidas desde los Estados Unidos. La expansión fue luego estimulada por las agencias nacionales de desarrollo, especialmente el INTA, por compañías multinacionales de agro-producción y sus

extensionistas, pero el mayor factor de impacto en el aumento de la producción de soja fue el dinamismo de la industria aceitera y de los sectores comerciales que vieron en la soja y en las condiciones agropecuarias pampeanas, óptimas posibilidades de obtención de renta.

Desde los años 70, la superficie sembrada ha crecido en forma sostenida pasando de 37.700 ha en la campaña 70/71 a las 11.500.000 ha en la campaña 2001-2002. Las principales características del cultivo de soja han sido: la gran expansión territorial-productiva (Figura I.1) y el nivel de estabilidad del valor agregado del grano.

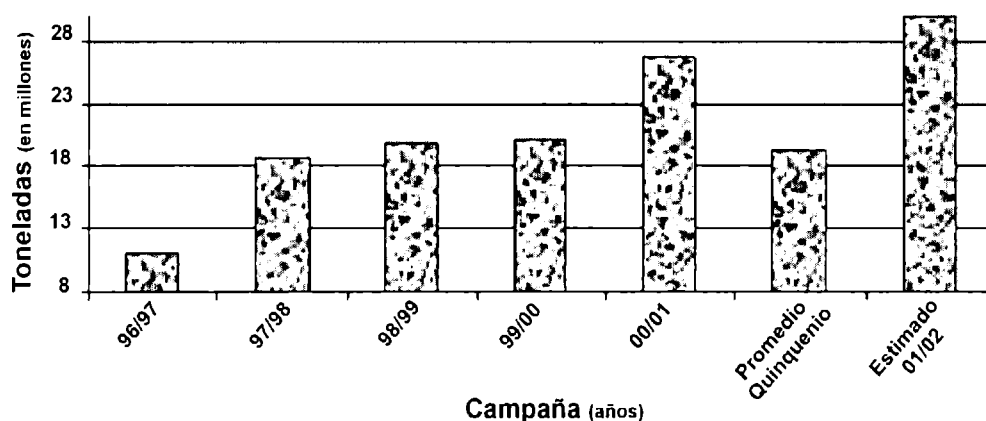


Figura I. 1: Evolución de la producción de soja, el gráfico muestra el aumento progresivo de la producción de soja en los últimos seis años. Fuente: www.mecon.gov.ar (2002)

La soja es actualmente el grano que ocupa la mayor área sembrada en la historia del país. La producción final para el año 2002, considerando los altos rindes obtenidos, se estima cercana a los 30 millones de toneladas.

Exportación e impacto en la economía argentina

En términos generales, el 70 % de la soja cosechada es transformada en las plantas aceiteras ubicadas en nuestro territorio. El consumo interno tanto de aceite como de subproducto es mínimo: 6 % en caso del aceite de soja y 1,2 % de los subproductos. Todo lo demás, el 93 % del aceite de soja y el 98 -99 % de los subproductos, se exportan.

De esta forma, el complejo oleaginoso se ha convertido en la principal exportación de la Argentina, con ventas que representan el 20% del total nacional. En el caso de los derivados de soja, las 15,85 millones de toneladas de exportación de harina de soja representan el 36,1% de las exportaciones totales a nivel mundial, ocupando el primer puesto, y seguido por Brasil con exportaciones de 10,88 millones de toneladas, y Estados Unidos con 7 millones de toneladas. Las exportaciones proyectadas en Argentina para la campaña 2002, de aceite de soja son de 3,62 millones de toneladas, el 41,6% del

comercio mundial, seguidos nuevamente por Brasil con 1,55 millones de toneladas y Estados Unidos con 980 mil toneladas (www.mecon.gov.ar, 2002).

En la actualidad la producción de soja tiene un papel fundamental en la economía argentina ocupando el tercer lugar en el mundo como productor de grano, después de USA y Brasil, el primer lugar como exportador de aceite y harina de soja. Como consecuencia, la soja es el producto de exportación de mayor incidencia en el PB agropecuario del país y el mayor generador de divisas. Mientras los granos predominantemente oleaginosos dependen casi exclusivamente de la evolución del precio de los aceites, la soja mantiene una mayor independencia frente a esas oscilaciones como consecuencia de la importante proporción de harinas de alto contenido proteico que se obtiene de su industrialización. Todos estos factores influyeron en que la soja junto al girasol fueran los cultivos que más inversión recibieran para el desarrollo de nuevas semillas incluyendo la tecnología de modificación genética dirigida (OGM). Este desarrollo apuntó especialmente al mejoramiento de caracteres vinculados con la productividad y calidad agronómica, en este sentido, el desarrollo de sojas transgénicas con resistencia al herbicida glifosato fue una de las variedades que mas éxito tuvo en su aplicación a campo.

Soja transgénica

La incorporación más reciente al proceso de agriculturización del cultivo de la soja, ha sido el uso de las variedades de soja transgénica resistentes a herbicidas ó sojas RR. Si bien estas “nuevas sojas” produjeron mejores rindes de cosecha, como contrapartida han incrementado la frecuencia y cantidad de aplicación de herbicidas, especialmente del glifosato (Figura I. 2), produciendo un alto consumo específico, en detrimento de las más de treinta moléculas distintas, utilizadas hasta entonces para tales fines.

La llegada de las primeras variedades transgénicas tuvieron escasa adaptación a nuestro sistema agrícola. Si bien no tenían buena *performance* en las condiciones agroecológicas argentinas, las compañías que las importaron implementaron un acelerado programa de adaptación que provocó un aumento importante en el uso de estas variedades. En el ciclo 2000/2001 se encuentran registradas más de cuarenta nuevas variedades de soja RR inscriptas o con su inscripción en trámite, sobre las 200 lanzadas al comercio semillero argentino entre 1993 y 1999. La compañía Nidera lidera el 67 % del mercado de semillas de sojas transgénicas seguida por Monsanto, Pioneer Hi-Bred y algunas empresas nacionales como Don Mario, La Tijereta o Relmo (Lehmann y Pengue, 2000).

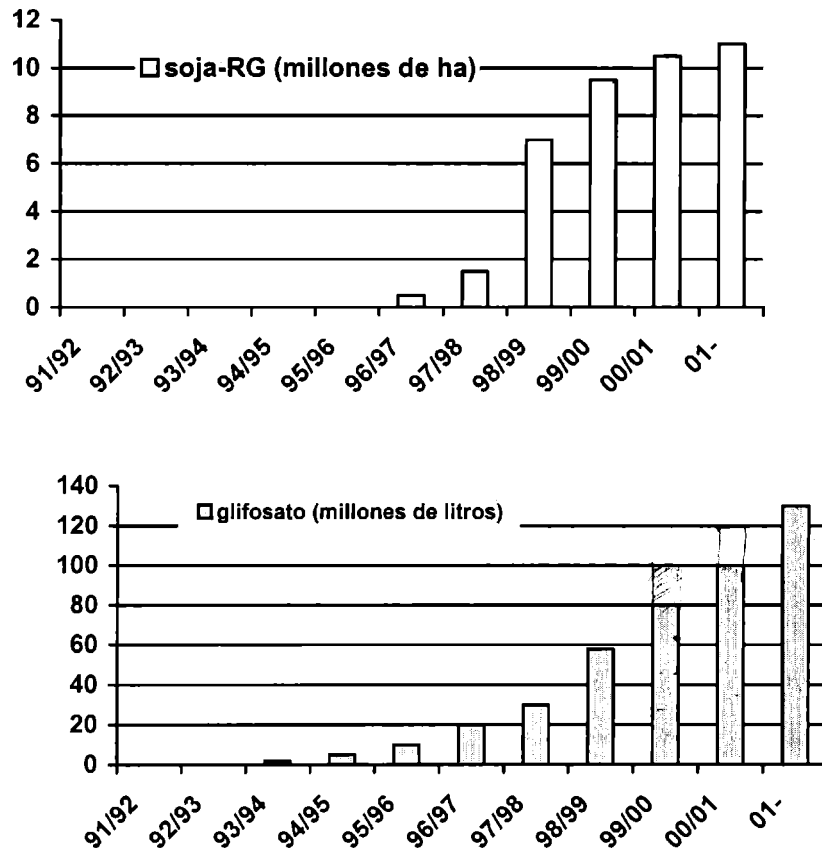


Figura I. 2: Soja transgénica: área sembrada y consumo de glifosato, los gráficos muestran un aumento paralelo entre la producción de soja transgénica y el consumo del herbicida glifosato.

De los 10 millones de hectáreas de cultivos transgénicos que se siembran en Argentina, se destaca la soja, ya que ocupa casi 9,5 millones de hectáreas, seguida por los maíces Bt (que son resistentes a algunos Lepidópteros por medio de la expresión de diferentes proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*) y los algodones Bt, con el mismo carácter insertado. De esta manera Argentina alcanza a tener un impacto en la producción mundial de transgénicos de más del 22 % (Figura 3).

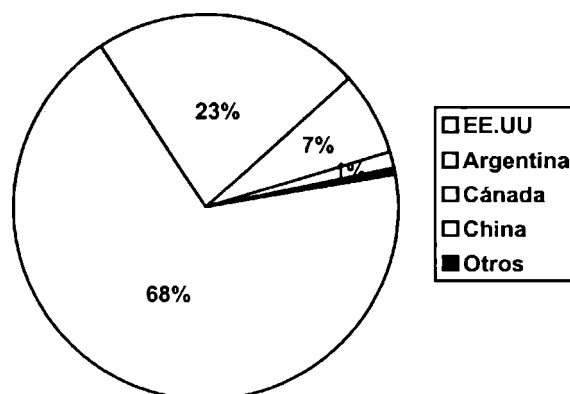


Figura I. 3: Producción mundial de cultivos transgénicos y participación de Argentina, con 10 millones de has de OGM, Argentina se ubica como el segundo productor mundial de semillas transgenicas, después de USA. De estos 10 millones, el 80% corresponde a soja RR. El 20% restante se divide entre maíz y algodón Bt (Fuente: ISAAA, 2000).

El nuevo modelo tecnológico provocó que el consumo de herbicidas aumentara a ritmo creciente, ritmo que se acelerará aún más en los próximos años ya que la soja es el principal responsable del crecimiento en la utilización de agroquímicos. El cultivo de soja demandó en 1997 el 42,7 % del total de productos fitosanitarios utilizados por los productores, seguido por el maíz con el 10,1 %, el girasol con 9,9 % y el algodón con el 6,9 %. Actualmente, las ventas más importantes del sector han sido las de glifosato, con unos 120 millones de dólares al año (Casafe, 2000).

El modelo que prima, en la realidad agroproductiva argentina, responde a la utilización de las mejores variedades comerciales de semillas y la aplicación intensiva creciente de agroquímicos. El alto rendimiento de las nuevas variedades de soja RR es en general muy dependiente del uso de herbicidas, plaguicidas y fertilizantes.

En el contexto que se ha comentado previamente, es muy claro que Argentina, como otros países subdesarrollados, sufrirá en un futuro cercano una importante alteración ó modificación de su ecosistema. El uso indiscriminado de agroquímicos y a la aplicación de los modelos agroproductivos comentados previamente no constituyen la mejor base para alcanzar una agricultura sustentable.

Plagas de la soja

El cultivo de soja es afectado, desde su nacimiento hasta la madurez del grano, por una gran variedad de plagas que producen distintos niveles de daño y que pueden tener importancia económica por las pérdidas ocasionadas. Durante las etapas de crecimiento (vegetativo) y desarrollo (reproductivo) del cultivo, las plagas principales pueden ser agrupadas en las categorías de barrenadores, orugas defoliadoras y complejos de chinches (Giorda y Baigorri, 1998, Cuadro I.1).

Plaga	Estado de desarrollo del cultivo	Momento para iniciar el tratamiento
"Barrenador de los brotes" <i>Epinotia aporema</i>	Período vegetativo	En variedades semitardías, con abundantes ramificaciones y condiciones favorables para el crecimiento, cuando se observe 40-50% de plantas atacadas. Bajo condiciones críticas de crecimiento, cuando se supere el 25% de plantas atacadas.
	Período reproductivo	En variedades de ciclo más corto, poco ramificadas y en condiciones favorables, cuando el número de plantas atacadas supere el 20-30%. En condiciones desfavorables, cuando se observe el 10%. Cuando se observa un 3% a 5% de plantas atacadas
"Oruga medidora" <i>Rachiplusia nu</i>	Emergencia hasta floración.	15-20 orugas mayores de 1,5 cm por metro lineal de surco. Más de 35% daño foliar.
"Oruga de las leguminosas" <i>Anticarsia gemmatalis</i>	Floración hasta madurez.	10 orugas mayores de 1,5 cm por metro lineal de surco. Más de 20-25% de daño foliar.
"Oruga militar tardía" <i>Spodoptera frugiperda</i>	Cultivo de 10-20 cm.	Cuando se detecten 2-3 orugas mayores de 1,5 cm por metro lineal de surco y daños en tallos y brotes.
	Período reproductivo	Cuando el 10-15% de las plantas presenten daño en flores y vainas.
"Chinches" <i>Nezara viridula</i> , etc	Formación del grano* (R3-R6)	Cuando se encuentren más de 2 chinches por metro lineal de surco.
	Endurecimiento del grano* (R7).	Cuando se encuentren de 4-5 chinches por metro lineal de surco.

Cuadro I.1: Plagas en soja (en sus diferentes etapas de crecimiento y tiempos de inicio de tratamiento)

A este listado pueden agregarse especies de importancia regional y/o esporádica, como los insectos del suelo y las tucuras. Asimismo, la amplia difusión y uso de la siembra directa ocurrida en los últimos años favoreció la aparición de otras plagas asociadas a suelos no roturados (<http://saenzpe.inta.gov.ar/Cereales/soja.html>, 2000).

Control de plagas en soja

En Argentina, la necesidad de control de plagas en soja hizo que el cultivo pasara a ser en pocos años el mayor usuario de insecticidas en el país. El control de las malezas también requirió altos niveles de herbicidas para combatirlas, incluso con cantidades de producto activo y valor económico mucho más elevados que el de los insecticidas. Para 1991 se estimaba que el gasto en plaguicidas utilizados en el país alcanzaba los 180 millones de dólares, un 50% del total de los mismos era destinado al cultivo de soja y de éstos, 30 millones correspondían sólo a insecticidas (<http://www.agrovision.com.ar/38/Manejo-plagas-soja.htm>).

El control químico, es el método de control más ampliamente difundido para reducir las poblaciones de insectos en soja y está basado principalmente en el uso de organofosforados, sus derivados y piretroides.

Entre las plagas mencionadas en el Cuadro I.1, haré especial referencia en esta descripción al insecto *Epinotia aporema*.

Control de *Epinotia aporema* en soja.

Para *Epinotia aporema*, la mayoría de los insecticidas recomendados en la actualidad son piretroides, que si bien presentan baja toxicidad para el hombre y organismos de sangre caliente, son tóxicos para insectos benéficos y para peces (Belarmino, 1992). Por otra parte, existen restricciones para su aplicación que oscilan entre los 20 y 45 días pre-cosecha (Giorda y Baigorri, 1998; Cuadro 2).

Debido a la protección que le brindan al “barrenador de los brotes” las hojas acartuchadas, vainas y brotes, los insecticidas que permiten un control eficiente son aquellos que tienen propiedades sistémicas o de penetración (generalmente fosforados o mezclas de fosforados y piretroides), usados en dosis 10 veces mayores a las necesarias para el control de orugas defoliadoras. En el Cuadro I.2, se muestran los valores comparativos de cantidades de productos químicos usados para el control de *E. aporema* en relación con lo que se usa para otros insectos habituales de los cultivos de soja (*Rachiplusia nu* y *Anticarsia gemmatalis*).

Principio activo	<i>Rachiplusia nu</i>	<i>Epinotia aporema</i>	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
Acefato 75%	1000	1300	700
Clorpirifos 48% E	400 - 500	1000 - 1100	600-650
Fentoato 50%	600	1400	
Metamidofos 60% L	650	1000 - 1200	
Metamidofos + Betaciflutrina		1000 + 50	

Monocrotofos 60% L	----	800 – 1000	
Monocrotofos + Deltametrina		700 + 100	
Monocrotofos + Cipermetrina		750 + 600	
Monocrotofos + Alfametrina		750 + 600	
Triazofos 40%	800	1100	1000
Alfametrina 15% E	25 - 30	600 + 700	35
Alfametrina + Clorpirifos			
Deltametrina 5% E	30 - 35	-	100-120
Deltametrina + Clorpirifos		1000 + 700	
Deltametrina + Clorpirifos Etil (0.8% + 57.6%)		500	
Esfenvalerato 5% E	100		160-180
Esfenvalerato + Fenpropatrina (7.5%+24%)	30 - 35	-	
Esfenvalerato + Fenitrothion (1.2%+80%)E		500-600	
Fenitrothion 100% E		650	
Cipermetrina + Clorpirifos (5%+50%) E	250	600	350
Cipermetrina + Triclorfon E (5%+50%)	350	600	350
Endosulfan + Permetrina E (35%+4%)	500	-	500
Endosulfan + Metomil E (30%+4%)		900	150

Cuadro 1.2: Productos y dosis registradas (lista parcial): Dosis (expresados en cm³/ha) de los productos químicos utilizados para el control del "barrenador de los brotes" *E. aporema* y las orugas defoliadoras *R.nu* y *A.gemmatalis*. Para la mayor parte de los productos químicos utilizados, *Epinotia aporema* requiere el doble o más cantidad de producto para lograr un control efectivo de la plaga.

Efectos de los insecticidas químicos usados para control de *E. aporema*

Los insecticidas químicos no sólo provocan efectos adversos sobre los insectos blanco, sino que también suelen ser nocivos para el ser humano y otros componentes del ecosistema. Los plaguicidas mencionados ejercen su mecanismo de acción sobre el sistema nervioso central al inhibir competitivamente a la acetilcolinesterasa y otras esterasas alterando el normal funcionamiento de las mismas. También afectan al ambiente debido a su alto poder residual y persistencia (resistencia química a la degradación), situación que favorece la incorporación a suelos, pasturas, vegetales y la contaminación de napas de agua.

La economía de los procesos de producción, aplicación y alta velocidad de acción de estos insecticidas han favorecido su uso indiscriminado. Simultáneamente con el aumento del uso de plaguicidas, crecieron muy significativamente los casos de intoxicación accidental y las enfermedades asociadas. Según datos de la OMS, anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas. De ese total, las 3/4 partes de los individuos afectados pertenecen a los países subdesarrollados, donde se utiliza el 25% de la producción mundial de plaguicidas.

***Epinotia aporema* “barrenador de los brotes de Soja”**

El “barrenador de los brotes” *Epinotia aporema* Wals. 1914 (Lepidoptera: Tortricidae), es un fitófago oligófago neotropical que presenta un área de distribución en el continente americano desde el sur de Estados Unidos hasta el centro de Argentina y Chile (Iede y Foerster, 1982). En nuestro país se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba, región del NOA y Chaco (<http://saenzpe.inta.gov.ar>; Villata y Ayessa, 1994).

Las larvas de *E. aporema* atacan preferentemente brotes, tanto terminales como laterales. Producen hilos sedosos con los que unen las hojas, dificultando el desarrollo normal de las mismas. El brote atacado puede secarse y las larvas se trasladan entonces a brotes vecinos o barrenan el tallo, deteniendo el crecimiento de la planta (Rojas, 1998). Un ejemplo de ataque se muestra en la Figura I. 4.

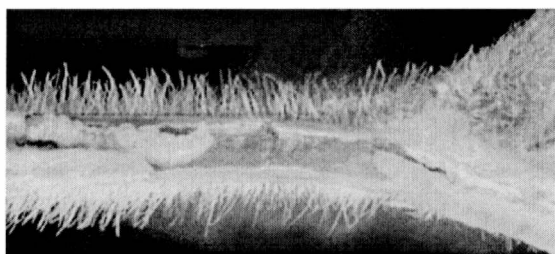


Figura I. 4: Daño producido por *E. aporema*; corte transversal de un tallo de soja, donde se puede apreciar uno de los diferentes tipos de daño que es ocasionado por *Epinotia aporema*, el efecto barrenador que se observa es lo que da origen al nombre vulgar de “barrenador de los brotes de la soja”.

En el período reproductivo, las larvas atacan flores y vainas, que pueden ser destruidas cuando son pequeñas. Si la infestación ocurre en vainas grandes, éstas son unidas por hilos sedosos que permiten a las larvas efectuar galerías superficiales entre vainas e introducirse en las mismas para alimentarse de los granos. Altos y prolongados niveles de infestación pueden provocar mermas del 50 al 60% en los rendimientos. Un efecto secundario de los ataques de *E. aporema*, es que el daño producido en brotes terminales hace que la planta rebrote lateralmente y se produzca una baja inserción de gran cantidad de vainas, situación que no permite que las mismas sean cosechadas, incrementando las pérdidas ocasionadas (Giorda y Baigorri, 1998).

En las últimas décadas este insecto ha alcanzado altos niveles poblacionales y se ha convertido en una de las plagas más difíciles de combatir, debido a diferentes razones. Cuenta todo el año con huéspedes alternativos: soja, poroto, lenteja, garbanzo, alfalfa,

maní, haba, trébol rojo, trébol blanco, lotus, y vicia (Villata y Ayessa, 1994). A su vez, el incremento numérico exhibido por el barrenador de los brotes *Epinotia aporema*, ha sido asociado al rápido incremento del área cultivada con soja y leguminosas forrajeras que se ha registrado a partir de la década del 70 en Argentina, Brasil, Chile y Uruguay. Por último, existen muy pocos parasitoides que lo controlen naturalmente en forma efectiva (Zerbino y Alzugaray, 1996; Rojas, 1999).

Los ataques al cultivo de soja se registran desde fines de diciembre hasta abril. En enero-febrero los daños se producen cuando el cultivo se encuentra en estado vegetativo, mientras que en marzo-abril, afectan la soja de segunda época de siembra, aunque ésta haya alcanzado su estado reproductivo.

Ciclo de Vida y Morfología

El ciclo de huevo a adulto tiene una duración de 35 a 40 días a una temperatura entre 21°C a 24°C, de los cuales 5 días corresponden al período embrionario y aproximadamente quince al pasaje por los diferentes estadios larvales. El estado de pupa tiene una duración de 9 a 13 días y el adulto, de 16 a 24 días (Goldberg *et al.*, 1999; Sciocco *et al.*, 2001; Figura I. 5).

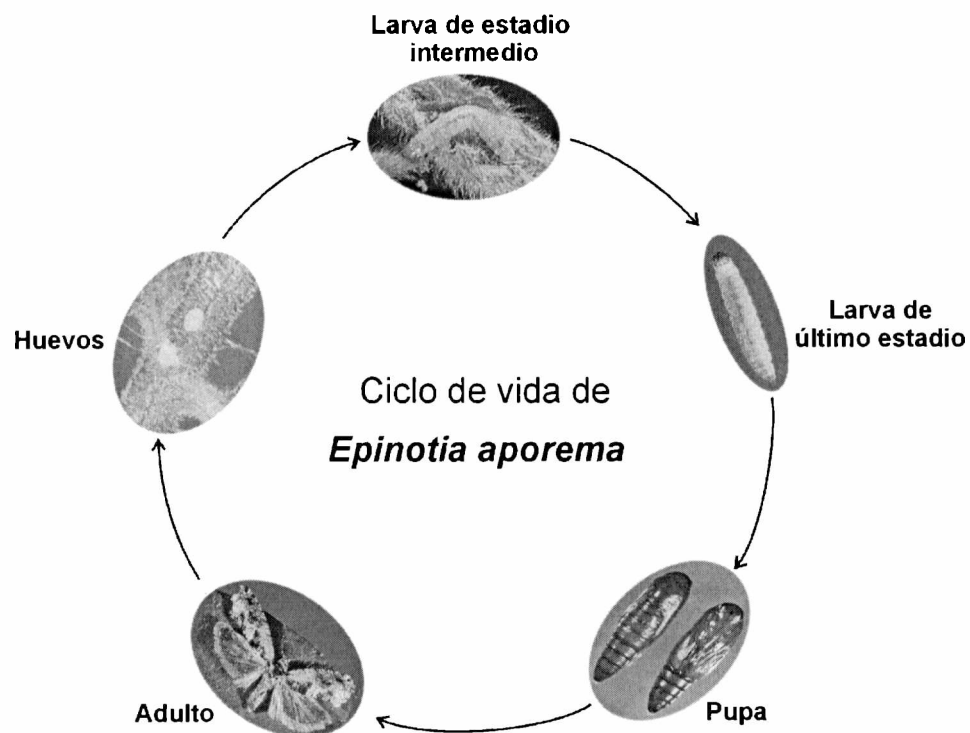


Figura I. 5: Esquema del ciclo de desarrollo del lepidóptero *Epinotia aporema* (barrenador de los brotes de la soja). En la figura no se muestran todos los estadios larvales, ni las diferencias entre los adultos macho y hembra.

Las larvas chicas, hasta el tercer estadio, presentan la cabeza negra y el cuerpo blanco verdoso, mientras que en el cuarto estadio las larvas se tornan rosadas y la cabeza

adquiere un color marrón claro. En los adultos, los sexos son diferenciables por los patrones de distribución de las escamas de color negro, castaño rojizo y gris claro de las alas anteriores; los machos son lateralmente oscuros y dorsalmente grisáceos, en tanto que las hembras tienen coloraciones oscuras desde el margen anterior hasta la mitad del ala y son grisáceas a los costados (Rojas, 1998).

En resumen y como fuera mencionado, el control de *Epinotia aporema* requiere insecticidas de amplio espectro y en mayor cantidad comparado con otras plagas de soja (Moscardi y Sosa Gomez, 1992; Ianonne y Leiva, 1992) aumentando sensiblemente el problema de contaminación ambiental.

Manejo integrado de plagas

Estimaciones de la FAO indican que en la presente década las pérdidas potenciales de alimentos y fibras provocadas por la acción de insectos, malezas y enfermedades alcanzarían entre 20 y 30 % de la producción mundial. Con una población en continuo aumento y mayores exigencias en cuanto a cantidad y calidad de los alimentos, la pregunta no es "**si**" hay que hacer control de las plagas, sino "**cómo**" se debe realizar este control para satisfacer las necesidades mencionadas.

En 1966, el comité de expertos de FAO, definió al **Manejo Integrado de Plagas (MIP)** como el sistema que, teniendo en cuenta el ambiente y la dinámica de la plaga, utiliza todos los medios apropiados disponibles en forma compatible entre sí, para mantener las poblaciones de las plagas por debajo de los niveles de daño económico. El concepto de MIP fue articulado originalmente entre entomólogos (Stern *et al.*, 1959), para luego extenderse progresivamente a la protección vegetal en un sentido amplio.

La estrategia global del MIP consiste en maximizar la acción de los factores de mortalidad natural y minimizar el uso de biocidas de origen químico. Esta estrategia se basa en que los cultivos pueden ser dañados hasta ciertos niveles sin sufrir pérdidas significativas, lo cual permitiría extender los plazos de control utilizando medios de mortalidad naturales en beneficio de la conservación general del ambiente. El objetivo no es eliminar totalmente las plagas, sino tratarlas de manera que no causen daños económicos en los cultivos.

El MIP es una estrategia comprendida dentro de una visión sustentable de la agricultura y requiere de una amplia participación de los agricultores, de los técnicos y de la comunidad en general.

Entre las tácticas que se utilizan para lograr un adecuado control de insectos se cuentan la integración del control químico, las prácticas culturales, las modificaciones del comportamiento de la plaga, los cultivares resistentes, y el control biológico.

Control Biológico

Es el control de plagas realizado por la acción de sus enemigos naturales. El control biológico comprende al control microbiano (patógenos) sumado a la acción de parasitoides y predadores (Figura I.6). Este tipo de control se evidencia en forma natural o por la acción del hombre a través de crianzas y liberaciones de estos microorganismos.

Los **predadores** se caracterizan por alimentarse de las plagas, principalmente insectos. Los insectos predadores incluyen tanto especies másticadoras como especies picadoras-chupadoras. Los **parasitoides** se caracterizan por realizar una parte de su ciclo de vida a expensas de un hospedador. Pueden ser endoparasitoides (internos), en los cuales, la hembra deposita sus huevos dentro del huésped o ectoparasitoides (externos), si los

huevos son depositados sobre el huésped. Los parasitoides de las plagas pertenecen casi exclusivamente a los órdenes de los himenópteros o avispas y los dípteros o moscas. Los parasitoides más importantes son moscas taquínidas (Diptera: *Tachinidae*) y diversas avispas (*Hymenoptera*) de las familias *Chalcididae*, *Braconidae*, *Pteromalidae*, *Trichogrammatidae*, *Eulophidae*, entre otras.

Tipo de enfermedad	Agente o Daño		Control	
No Infecciosas	[Físico] Biológico	
		Químico		
		Nutricional		
		Metabólico		
		Genético		
		Neoplásico		
		Teratológico		
Infecciosas	[Virus] Microbiano
		Bacterias		
		Hongos		
		Protozoos		
		Nemátodos		
	Parasitoides (insectos)			
	Predadores			

Figura I. 6. Clasificación de los diferentes agentes causales de mortalidad de insectos sobre la base del tipo de enfermedad que ocasionan. El control biológico, considera la acción del control microbiano sumado al efecto de los predadores y parasitoides, lo cual aumenta su efectividad (modificado de Steinhaus, 1963).

Los **patógenos** que atacan insectos (entomopatógenos) generalmente matan a su hospedador como consecuencia del desarrollo de una enfermedad, estos comprenden a virus, bacterias, hongos, protozoos y nematodos. Los más conocidos son los virus y las bacterias por su relativa facilidad de reproducción y, comparado con los hongos, por ser relativamente menos dependientes de las condiciones ambientales (humedad, temperatura).

Patología de insectos

Las primeras investigaciones sobre entomopatógenos fueron impulsadas en beneficio de la actividad económica referida a la cría del gusano de seda y de la abeja, dando nacimiento de esta forma, al campo de la ciencia conocido como patología de insectos. Esta disciplina abarca el estudio de los principios generales de las enfermedades de los insectos: etiología, patogénesis, sintomatología y epizootiología.

Las aplicaciones de la patología de insectos incluyen: el uso de agentes (físicos, químicos y biológicos) para el control de insectos perjudiciales y la supresión de enfermedades de insectos comercialmente útiles (profilaxis y terapéutica)(Figura 1.6). El primer caso comprende a los insectos que ocasionan daños en cultivos agrícolas (plagas) y a los vectores de enfermedades de animales y humanos. Por lo tanto, las áreas de mayor impacto de esta aplicación son la agricultura y la medicina.

En el ámbito de la agricultura, algunos patógenos han sido producidos en masa y se encuentran disponibles en formulaciones comerciales. El efecto requerido del método de control biológico es similar al de un insecticida químico. El “principio activo” de un bioinsecticida consiste en un patógeno con alta virulencia y de rápida multiplicación, presentado bajo una formulación que asegure su eficacia y permita su fácil almacenamiento y su aplicación a altas dosis. Algunos de estos todavía se encuentran en fases experimentales, otros ya están disponibles desde hace varios años.

A diferencia de los insecticidas químicos o sintéticos, los insecticidas microbiológicos no actúan tan rápidamente, es decir, puede tomar más tiempo en eliminar o debilitar a la plaga blanco. Esto puede limitar su uso en los cultivos que pueden tolerar solo un cierto grado de daño. Para ser efectivos, la mayoría de los bioinsecticidas deben ser aplicados cuando la plaga se encuentra en una etapa específica de su ciclo, por lo que es necesario conocer el ciclo de vida de la plaga a tratar.

Los bioinsecticidas deben poseer las características de:

- Matar, reducir la reproducción, reducir el crecimiento o acortar la vida de la plaga.
- Ser específicos de ciertos tipos de insectos, incluso para las diferentes etapas de su ciclo de vida.
- Ser eficaces (la eficacia depende de las condiciones ambientales y de la abundancia de los huéspedes).
- Ser relativamente rápidos. El grado de control de una plaga, por parte de estos organismos es impredecible, generalmente actúan lentamente, tomando varios días para proporcionar un control adecuado.
- Tener capacidad para producir epizootias.

Propiedades de los Entomopatógenos

Las posibilidades de interacción entre un microorganismo entomopatógeno y el espectro potencial de huéspedes en la naturaleza, pueden llevar a diferentes grados de desarrollo de la enfermedad, debido a las características individuales de los organismos intervinientes y a factores poblacionales y ambientales.

Se entiende por **infectividad** a la habilidad del patógeno para producir infección (ej. entrada del virus a un insecto susceptible). La infección puede resultar en provocar o no una condición de enfermedad. La determinación de la capacidad infectiva del patógeno sobre un hospedante se basa en el resultado de ensayos de laboratorio bajo condiciones controladas (bioensayos). En un bioensayo se utilizan cargas de inóculo generalmente altas, tales como las que pueden alcanzarse en el campo por la aplicación de un bioinsecticida.

Por su parte, la **virulencia** se refiere al “poder” de un microorganismo de provocar enfermedad, es la habilidad del microorganismo de invadir y causar daño en su huésped. Un patógeno puede ser altamente virulento porque los mecanismos de defensa del huésped están disminuido, a su vez puede tener baja virulencia si el huésped tiene baja susceptibilidad. La virulencia es una propiedad que puede ser modificada, un patógeno puede ser modificado para aumentar o disminuir su virulencia. Por otro lado la **patogenicidad**, incorrectamente asociada al termino virulencia, es la habilidad de producir enfermedad y está genéticamente determinada.

La dosis infectiva se expresa (cuantitativamente en términos de susceptibilidad del huésped) como porcentaje de mortalidad, concentración letal media (LC_{50}) o dosis letal media (LD_{50}) o tiempo letal medio (LT_{50}) (Tanada y Kaya, 1993).

El caso de bioinsecticida más difundido es el de la bacteria ***Bacillus thuringiensis*** (aislada en 1902 por Ishiwata, en Japón, y en 1915 por Berliner, en Alemania). Su lanzamiento comercial como bioinsecticida comenzó en Francia, en 1938, para convertirse desde entonces en el insecticida microbiano más comercializado en todo el mundo (Luthy *et al.*, 1982). Otros casos muy difundidos son los **hongos** con *Beauveria bassiana* como representante del grupo (contra *Hypothenemus hampei*, *Diaprepes abbreviatus*) y los **virus**.

Entre los **entomopatógenos virales** más conocidos y más estudiados, se encuentran los que pertenecen a la Familia *Baculoviridae*. Es uno de los grupos de virus que cuentan con mayor difusión como bioinsecticidas debido a su alta virulencia y especificidad. La compatibilidad de uso de los baculovirus con otras medidas de control de insectos plaga, los hace excelentes candidatos para ser utilizados dentro de un programa de manejo integrado de plagas (Groner, 1989; Tanada y Kaya, 1993; Miller, 1996).

Baculovirus – Virus entomopatógenos

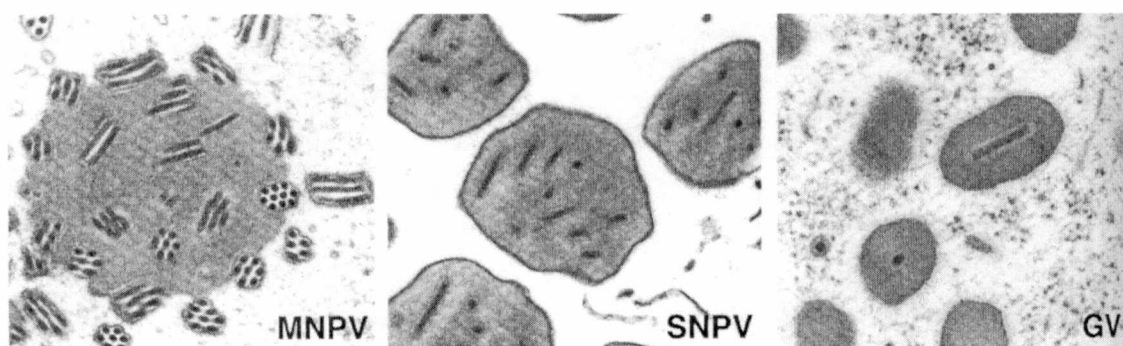
Características de la Familia *Baculoviridae*

La familia *Baculoviridae*, taxonómicamente comprende a virus que poseen una única molécula de DNA doble cadena, circular cerrado y superenrollado con un tamaño promedio de 80 a 180 kpb, empaquetada en una nucleocápside envuelta (Blissard *et al.*, 2000). El nombre de la familia deriva del latín *baculum*, cuyo significado es bastón ó varilla, aludiendo a la forma de las partículas virales (Miller. 1996).

Su patogenicidad está restringida al *filum* Artropoda. La mayor parte de los Baculovirus han sido aislados de la clase *Insecta*, en particular de los Ordenes Lepidoptera, Hymenoptera, Neuroptera, Thysanura y Trichoptera. En menor medida, se han aislado también de otros artrópodos, de la Clase *Crustacea*, Orden Decapoda (Francki *et al.*, 1991, Wang *et al.*, 1996). Sin embargo, los aislamientos individuales exhiben normalmente un rango de hospedador limitado e infectan sólo especies estrechamente relacionadas (Groner, 1989).

La familia *Baculoviridae* está compuesta por dos géneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) y *Granulovirus* (GVs) definidos sobre la base de las características de los cuerpos de oclusión (OBs, ver más adelante: fenotipos virales) De acuerdo a esto, se llaman *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) los baculovirus que presentan uno o varios viriones ocluidos en una matriz de proteica (constituida principalmente por poliedrina), formando cuerpos de oclusión poliédricos de un tamaño promedio de 0,5 a 15 µm. Los viriones ocluidos pueden contener una sola nucleocápside: *Single Nucleocapsid Polyhedrovirus* (SNPV) o varias nucleocápsides dentro de una misma envoltura, *Multiple Nucleocapsid Polyhedrovirus* (MNPV).

El género *Granulovirus* (GVs) se caracteriza por poseer, en cambio, un solo virión rodeado de la proteína granulina y formando un gránulo ovocilíndrico de aproximadamente 0.3 x 0.6 µm (Blissard *et al.*, 2000; Figura 1.7).



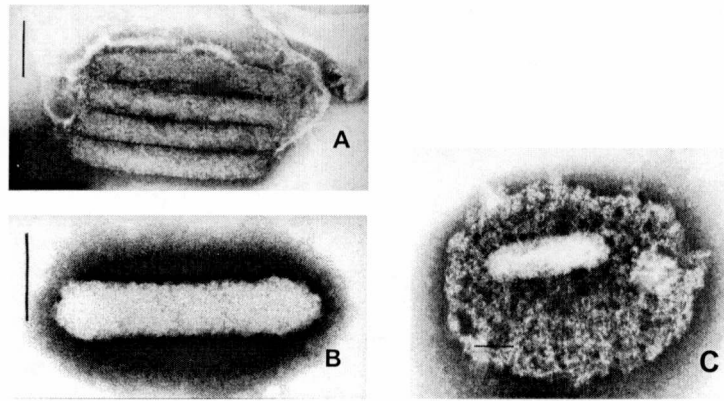


Figura 1.7: Baculovirus, cuerpos de oclusión y viriones; En el panel superior se muestran micrografías de cortes de cuerpos de oclusión (OB; *occlusion body*) de la miembros de la familia *Baculoviridae*, MNPV, SNPV y GV (ICTV). En **A, B y C** se muestran diferentes tipos de OBs post-disolución en carbonato de sodio: Los cuerpos disueltos fueron teñidos con 2% PTA (ácido fosfotúngstico). En **A** se observa el OB disuelto de un Nucleopoliedrovirus múltiple (MNPV) que libera cuatro nucleocápsides. En **B**, se observa el OB disuelto de un SNPV, con una nucleocápside envuelta. En **C** se observa un la única nucleocápside de un OB disuelto de un *Granulovirus*. Barra = 100 nm. (Las micrografías electrónicas pertenecen al *Department of Microbiology, Medical Faculty, Quebec, Canadá*)

El patrón de replicación de los baculovirus es complejo. Durante el ciclo de infección se observa la producción de progenie con dos fenotipos diferentes, los OBs y los BVs (*occlusion bodies* y *budded virus* respectivamente) (Figura 1.8). Ambos fenotipos poseen la misma información genética. En general y muy brevemente, porque será descrito en detalle más adelante, cada ciclo se puede dividir en dos etapas, en una primera etapa y como resultado de la ingestión de OBs, se liberan los ODVs (*occlusion derived virus*) que inician la infección primaria. En una última etapa se produce la infección secundaria que es originada por el fenotipo viral BV, que disemina la enfermedad a través del hemocele.

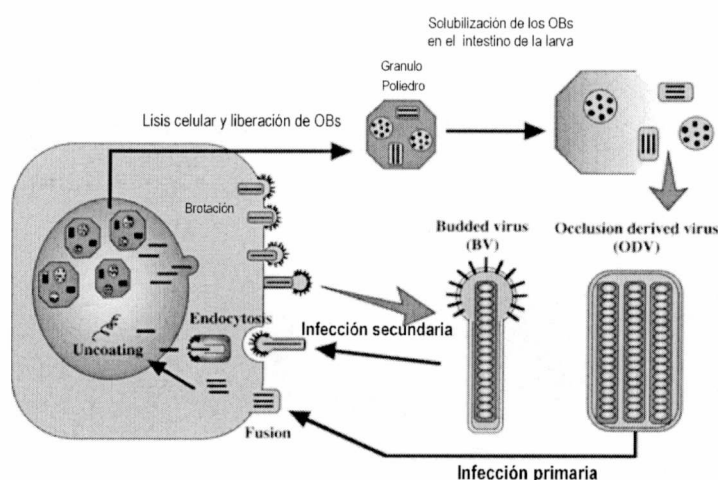


Figura 1.8: Ciclo de infección en baculovirus. Los ODVs liberados a partir de OBs inician la infección primaria en el intestino de la larva. Los BVs continúan el proceso de infección al resto de los tejidos, provocando la infección secundaria.

Estructura de la partícula viral

La nucleocápside, de forma abastionada y tapada en ambos extremos, posee un núcleo ó *core* cilíndrico de DNA condensado con proteínas, con un tamaño promedio de 50 x 300 nm, aunque la longitud puede ser variable en función del tamaño del genoma viral (Federici, 1986; Tanada y Hess, 1991; Caballero, 2001). Dentro de la nucleocápside, la única molécula de DNA está unida a proteínas básicas y al menos a dos o tres proteínas adicionales. La proteína básica mayoritaria unida al DNA (P6.9), es de bajo peso molecular, rica en arginina, del tipo de las protaminas que favorece la compactación del DNA (Funk *et al.*, 1997). El DNA purificado de los baculovirus es capaz de iniciar la infección y producir virus viable (por transfección de células o inyección intrahemocélica de larvas) (Potter y Miller, 1980; Croizier *et al.*, 1988), lo cual sugiere que las proteínas asociadas con las nucleocápsides u otras estructuras del virus no son esenciales para su replicación (a diferencia de lo que ocurre con otros virus).

La función de la nucleocápside es transportar la información genética viral hasta la célula huésped de manera altamente compactada. El modelo actualmente aceptado de la estructura de la cápside consiste en una serie de anillos apilados perpendicularmente que forman la estructura cilíndrica (Federici, 1986). Todos los anillos están formados por un número constante de subunidades proteicas (Burley *et al.*, 1982) y entre un anillo y el siguiente hay una separación aproximada de 4.5 nm (Beaton & Filshe, 1976). El componente más importante de esta estructura es la proteína VP39 la cual está distribuida por toda la superficie de la cápside sin formar parte de las estructuras especializadas (Russell *et al.*, 1991). Otros componentes minoritarios son la proteína P24, la P80, y la fosfoproteína PP78/83. Las proteínas VP39 y PP78/83 intervienen activamente en el desplazamiento de la nucleocápside a través de la célula huésped a través de su asociación con los filamentos de actina (Charlton y Volkman, 1995). Además, la proteína PP78/83 está localizada únicamente en la base de la cápside y resulta esencial para la estructura conservada de la nucleocapside y para la viabilidad del virus (Funk *et al.*, 1997; Possee *et al.*, 1991). Se ha postulado la existencia de una fosforilasa, que se activaría cuando la nucleocápside queda alineada con los poros de la membrana nuclear y cuya función sería fosforilar la P6.9 para producir el desempaquetamiento del ADN y su liberación al núcleo para iniciar la replicación (Caballero, 2001; Wilson y Consigli, 1985 a,b; Miller *et al.*, 1983).

Fenotipos del Virión

Los viriones (ODVs y BVs) son los elementos infecciosos de los baculovirus. El virión maduro se forma cuando en un momento determinado de la replicación, la nucleocapside adquiere una membrana compuesta por lípidos y proteínas. El origen de esta membrana es lo que provoca la existencia de dos fenotipos para los viriones infectivos: los viriones

brotantes (BVs, *budded virus*) y viriones derivados de cuerpos de oclusión (ODVs, *occlusion derived virus*). Ambos difieren en morfología, composición proteica, origen de la envoltura, modo de penetración en las células y en su infectividad relativa para los diferentes tejidos huésped ó cultivos celulares (Miller, 1996; Braunagel y Summers, 1994) (Figura I.9).

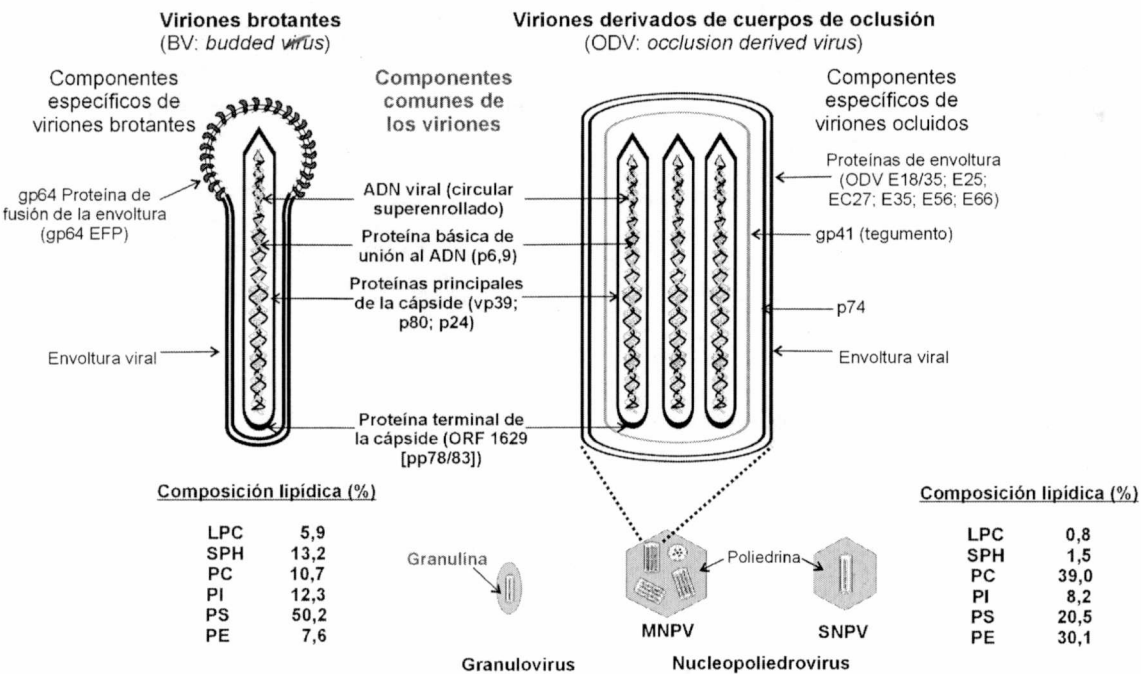


Figura I. 9: Esquema de los dos fenotipos de viriones de los baculovirus: viriones brotantes ó BV (*budded virus*) y viriones ocluidos ó ODV (*occlusion derived virus*), localización de las proteínas y de los componentes estructurales comunes y los específicos a cada uno de ellos. El esquema de los ODVs corresponde a la estructura de una multicápside de nucleopoliedrovirus (MNPV). La estructura de los SNPV (*single nuclear polyhedrovirus*) y GV (*granulovirus*), es equivalente a la representada, la única diferencia es el número de nucleocápsides por cuerpo de oclusión. También se detalla la composición lipídica de los BV y ODV derivan de *AcMNPV* producidos en células Sf-9 (LPC: lisofosfatidilcolina, SPH: esfingomielina, PC: fosfatidilcolina, PI: fosfatidilinositol, PS: fosfatidilserina, PE: fosfatidiletanolamina) (Braunagel y Summers, 1994). Este esquema se ha realizado sobre la base de información del virus prototipo de la familia *Baculoviridae*, *AcMNPV* (*Autographa californica* MNPV).

En los BVs, la envoltura del virión deriva de la membrana celular de la célula infectada y siempre contienen una sola nucleocápside. En los ODVs la cubierta del virión es ensamblada en el nucleoplasma de la célula infectada, aunque el origen de esta membrana es aún desconocido. A su vez los ODVs poseen dos aspectos morfológicos, los que contienen una nucleocápside por virión, llamados viriones simples (S) y los que contienen un número variable, llamados viriones múltiples (M). Los ODVs ya sean de uno u otro tipo están presente en todos los baculovirus conocidos. Las nucleocápsides de los ODVs y BVs tienen la misma estructura y comparten la mayoría de los componentes estructurales a excepción de las proteínas ODV-EC 27 y P74 que parecen ser específicas de los ODVs.(Braunagel *et al.*, 1996b; Hill *et al.*, 1993; Kuzio *et al.*, 1989).

Tal vez para entender en detalle la generación de estos diferentes fenotipos se debe conocer primero el ciclo de infección viral, que será explicado más adelante y que es en definitiva lo que provoca la aparición de uno u otro fenotipo.

Los BVs y ODVs tienen diferente composición lipídica, proteica y en carbohidratos presentes como glicoproteínas y glicolípidos, aunque hay un cierto porcentaje de componentes que es común a ambos fenotipos. Los diferentes orígenes de las membranas que envuelven a los BVs y los ODVs son los que provocan la existencia de diferente composición proteica en los BVs y ODVs.

La proteína principal de los BVs, la gp64 no se ha observado en los ODVs (en GVs, la proteína Ld130 se postula como proteína funcionalmente equivalente a la gp64, pero aún se desconoce su ubicación en el virión). Aparentemente la gp64 (o Ld130) de los BVs es una proteína fusogénica que está presente en todos los baculovirus secuenciados hasta la fecha (Funk *et al.*, 1997) y aparece típicamente concentrada en uno de los extremos del virión dando lugar a una estructura específica en forma de espícula o “peplomer” (Volkman, 1986). Esto sería lo que le confiere especificidad tisular al virión con lo cual se transforma en una proteína esencial para la propagación del virus de una célula a otra (Monsma *et al.*, 1996).

En tanto que la gp41, es una proteína glicosilada del tegumento de los ODVs que es muy abundante y se ha observado que no está presente en los BVs, esta proteína se cree que esta ubicada en una zona intermedia entre la nucleocápside y la membrana de los ODVs, llamada tegumento (Kawamoto y Kumada, 1977; Liu y Maruniak, 1995) y cuya función es todavía desconocida. Todas estas diferencias influyen en el mecanismo de infección.

Cuerpos de Oclusión

Como se mencionó previamente, los BVs y ODVs se encuentran embebidos en una matriz proteica, formando los cuerpos de oclusión (OBs), y compuesta primariamente de un polipéptido simple que forma una trama cristalina alrededor del virión (Blissard *et al.*, 2001) (Figura I.9). Esta matriz proteica esta compuesta principalmente de la proteína poliedrina en los NPVs y granulina en el caso de los GVs; se producen en grandes cantidades al final del proceso infeccioso y están ambas estrechamente relacionadas, teniendo un peso molecular aproximado de 25 a 33 kDa y una homología en aminoácidos del 50% (Rohrmann, 1992).

Los OBs son liberados al ambiente una vez que el cadáver del huésped se ha desintegrado, son una forma “ambientalmente resistente” que adoptan los baculovirus, en la cual los viriones se encuentran a salvo del estrés ambiental y otros procesos de degradación al que se ven expuestos. Los OBs son insolubles en agua, resistentes a la putrefacción y desintegración por agentes químicos (Benz, 1986). Sin embargo, son

solubles en soluciones alcalinas (pH 9 -11), lo que facilita la liberación de los ODVs *in vitro* e *in vivo* (en el tubo digestivo medio de los lepidópteros (Granados y Williams, 1986).

Los OBs maduros tienen también una cubierta adicional conocida como *calix*, este calix contiene proteínas y carbohidratos (Figura I.10). La proteína mayoritaria es la PP34 (ICTV), la delección de la PP34 produce OBs de menor tamaño y con pequeños cráteres en la superficie (Gross *et al.*, 1994).

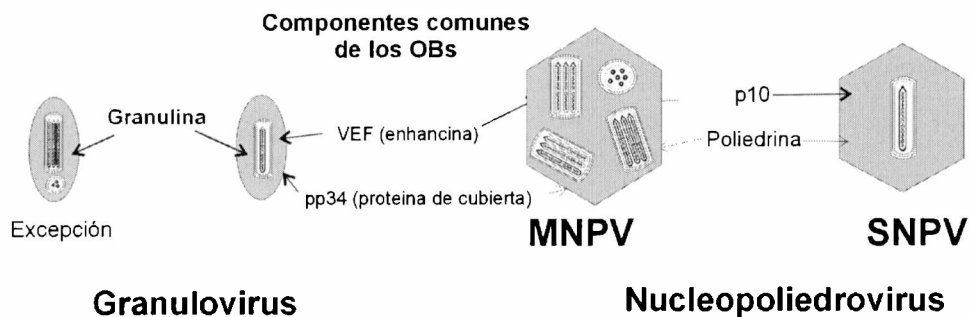


Figura I.10: Esquema de las características morfológicas y composición proteica de los OBs de los géneros Granulovirus (GVs) y Nucleopoliedrovirus (NPVs). Los GV, presentan regularmente una única nucleocápside por virión, inmersa dentro de la matriz de granulina del cuerpo de oclusión, excepcionalmente se han observado dos o más nucleocápsides por virión. Los Nucleopoliedrovirus (NPVs), se dividen en MNPV (multinucleocápsid viral) si poseen varias nucleocápsides por virión ó SNP (singlenucleocápsid viral) si solo poseen una nucleocápside por virión.

También se ha informado la presencia de una proteína (que alcanza a un 5% del total), llamada *Enhancina* ó VEF (*Viral Enhancing Factor*), la misma es una metaloproteasa de 104 kDa y tiene la función de digerir las proteínas de alto peso molecular que forman la membrana peritrófica del tubo digestivo de los insectos, aumentando la susceptibilidad de las larvas y facilitando la infección (Lepore *et al.*, 1996; Gijzen *et al.*, 1995; Gallo *et al.*, 1991; Derksen y Granados, 1988).

Finalmente, tanto gránulos como poliedros tienen asociados una proteasa alcalina que posee las mismas propiedades de las proteasas aisladas del tubo digestivo de insectos (Rubenstein y Polson, 1983) y que favorece la liberación de los viriones. El origen de la presencia de ésta proteasa provendría de una contaminación en los OBs al pasar por el tubo digestivo, ya que se observó que en poliedros obtenidos de cultivo celular ésta actividad proteásica está ausente (Wood, 1980).

Ciclo de Infección

El ciclo de infección comienza cuando los OBs son ingeridos por los insectos. Los insectos son horizontalmente infectados por baculovirus. Como se mencionara anteriormente, los OBs dan resistencia a los viriones en el medio externo pero también dan protección para que se “disuelvan o procesen” en el lugar correcto.

Infección Primaria

Según Granados y Williams (1986), la forma más común de inicio de infección primaria es por ingestión de cuerpos de oclusión u OBs presentes en la dieta contaminada de los insectos (Figura I. 11). También se han descrito otras vías de entrada que favorecería este tipo de infección, tales como la transmisión transovárica y por contaminación superficial de los huevos al momento de producirse la ovoposición por parte de las hembras infectadas (Smith y Vlák, 1988; Tanada y Kaya, 1993; Kukan, 1999).

La primera barrera con que se encuentran los ODVs una vez liberados de los OBs, es la membrana peritrófica (Derksen y Granados, 1988) compuesta de capas múltiples que impiden el paso de partículas del tamaño de los viriones.

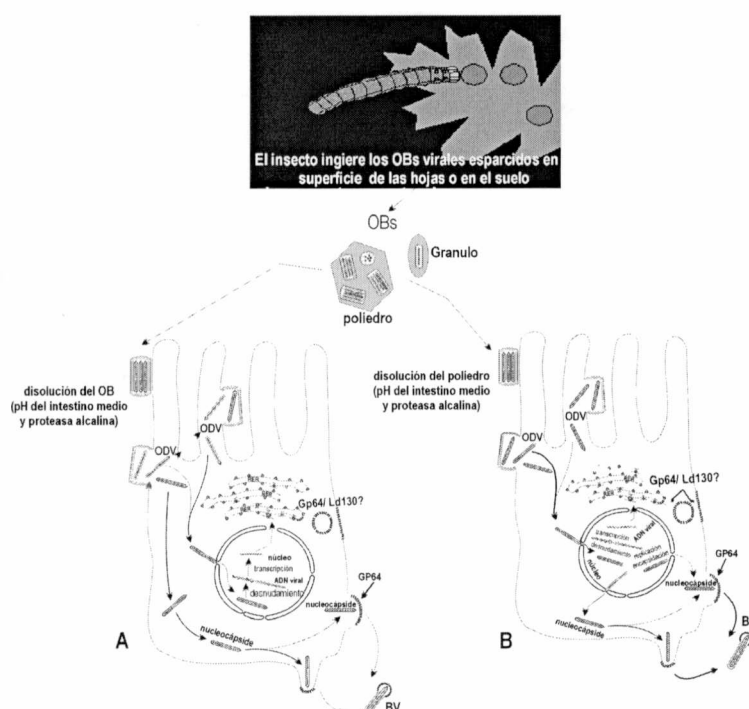


Figura I.11: Infección primaria y producción de BVs. Los cuerpos de oclusión (OB, poliedros en NPVs o gránulos en GV) liberados al ambiente como consecuencia de la muerte y lisis de insectos infectados, son ingeridos junto con el follaje por un nuevo huésped y disueltos en su intestino medio. Estos ODV infectan las células epiteliales del intestino con gran eficiencia. **A.** Granados y Lawler (1981) propusieron un mecanismo de producción de BVs, que no requiere de la replicación y consiste en una rápida conversión de ODVs en BVs. **B.** Habiendo recorrido los OBs el mismo camino que en **A**, una vez ingresadas en la célula, las nucleocápsides migran hacia el núcleo, donde se produce el desnudamiento del DNA y la cascada de eventos moleculares asociados con la transcripción/replicación. Los BVs producidos son liberados a hemolinfa y continúan el proceso infeccioso. Con el fin de clarificar la interpretación del mecanismo, no se han respetado las proporciones correspondientes en algunos detalles.

Granados y sus colaboradores han estudiado y demostrado que hay proteínas contenidas en los gránulos, tales como las VEF, que actúan alterando la integridad de la membrana peritrófica y aumentando la infectividad (Wang y Granados, 1997; 1998).

Posteriormente los viriones se unen por fusión a la membrana citoplasmática de las microvellosidades de intestino medio (Granados, 1978; Granados y Lawler, 1981; Horton y

Burand, 1993; Engelhard *et al.*, 1994). También para este proceso se ha demostrado que existen proteínas específicas de los ODVs que podrían inducir tal fusión (Russell y Rohrmann, 1993; Braunagel *et al.*, 1996; Theilmann *et al.*, 1996).

A partir de la fusión, las nucleocápsides penetran al citoplasma y aquí se presentan dos posibilidades. Granados y Lawler (1981) propusieron una alternativa en la cual el mecanismo de producción de BVs, no requiere de la replicación y consiste en una rápida conversión de ODVs en BVs (Figura I.11.A). La segunda alternativa es que una vez ingresadas en la célula, algunas de las nucleocápsides migran hacia el núcleo, donde se produce el desnudamiento del DNA, la transcripción, esencialmente, de gp64 (Ld130? para los GVs) y, posteriormente, la síntesis activa de GP64/Ld130 en el RER (retículo endoplásmico rugoso) y su transporte a la membrana plasmática, donde se forman conjuntos en la región basal/basolateral y de allí se dirigen al núcleo, lugar en el que liberan el DNA a través de los poros nucleares, (Figura I.11.B) (Granados y Williams, 1986). El núcleo se hipertrofia, los nucleolos se mueven hacia la periferia nuclear y disminuyen su tamaño.

La transcripción de los primeros genes virales comienza por la acción de la RNA polimerasa II del huésped para luego continuar con la RNA pol del virus (Blissard y Rohrmann, 1990). Se ponen en funcionamiento cascadas regulatorias del DNA, se genera la nueva progenie viral y se comienzan a ver alteraciones en las funciones fisiológicas del insecto huésped que beneficia al mejor desarrollo de la viremia y enfermedad. Este proceso hace que se produzcan nuevas nucleocápsides que al pasar a través de la membrana nuclear adquieren su propia envoltura y así emergen como viriones brotantes o BVs que serán capaces de atravesar la lamina basal para circular libremente por la hemolinfa (Granados y Lawler, 1981).

Aunque las células del intestino medio son la vía más común de inicio de infección primaria, se ha demostrado que no es la única. Los estudios realizados mostraron que una porción de nucleocápsides del inóculo puede penetrar directamente a través del epitelio del intestino medio, atravesar la lamina basal y diseminarse sistémicamente por el hemocoele (Granados y Williams, 1986; Keddie *et al.*, 1989). Incluso en algunos GVs no se han detectado focos de infección en el intestino medio, presumiéndose que se produce un pasaje de partículas infectivas, en pequeñas porciones del intestino, a través de los espacios intercelulares (Begon *et al.*, 1993).

Infección Secundaria

Una vez que se ha producido la primera progenie viral, comienza la dispersión del virus hacia las células de otros tejidos que serán infectados. Este es el primer paso para comenzar la infección secundaria. Existen ciertos interrogantes respecto de cual es la vía

principal de diseminación de la infección dentro del hemocelo del insecto. Se sabe que los hemocitos y las células traqueales infectadas que rodean los tejidos son los elementos que juegan el rol más importante en el proceso de diseminación.

Utilizando técnicas de microscopía electrónica se observó que son los BVs los encargados de atravesar la membrana basal para iniciar la infección secundaria (Granados y Lawler, 1981). Según estos autores serían los hemocitos los que actúan como “fabricantes” eficientes de BVs para continuar el proceso infeccioso.

En 1977, Adams *et al.*, había sugerido que otra vía posible de diseminación serían las traqueolas, lo cual fue confirmado luego por medio de estudios realizados en larvas de TniGV, que fueron infectadas *per os* con un baculovirus recombinante de AcMNPV - β -galactosidasa de *E.coli* bajo el promotor *hsp70* de *Drosophila melanogaster*. Observando la expresión de este gen se determinó la función del sistema traqueolar y las células traqueales en la diseminación de la enfermedad desde el intestino medio hacia el resto de los tejidos (Engelhard *et al.*, 1994). Estos resultados fueron también obtenidos sobre larvas de *Heliothis zea* y *H. virescens* (Kirkpatrick *et al.*, 1994; Washburn *et al.*, 1995).

El proceso de infección secundaria continúa con la entrada de los BVs a cada célula (Figura I.12), que se produce por endocitosis (Volkman y Goldsmith, 1984, 1985). El tropismo hacia los tejidos susceptibles a la infección es variable y depende tanto del virus como del huésped que se estudie.

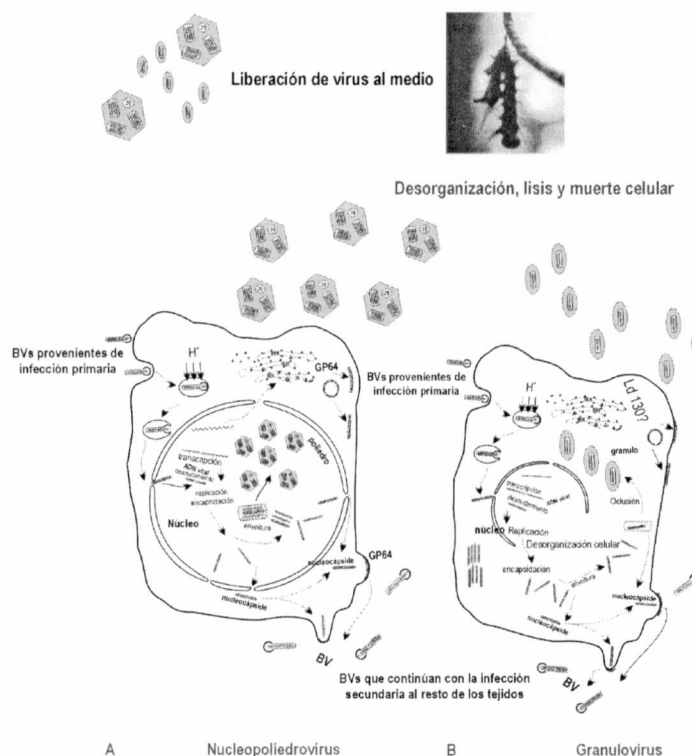


Figura I. 12. Infección secundaria y producción de OBs. Los BVs generados en las células epiteliales (o células infectadas de otros tejidos) entran a una nueva célula huésped por endocitosis, probablemente mediada por interacción de GP64 con un receptor. Una vez liberada la vesícula endosomal en el citosol, se produce la acidificación del contenido vesicular llevando a la fusión de las membranas

viral y endosomal, en la cual permanece GP64. Esta fusión dependiente del pH, conduce a la liberación hacia el citosol de las nucleocápsides, que migran hacia la membrana nuclear, e ingresan por los poros nucleares. **A:** Para NPVs, en la fase tardía de la infección, se produce el ensamblaje de nuevas nucleocápsides dentro del núcleo. Las mismas salen del núcleo por los poros nucleares y migran hacia la porción basal de la célula para brotar por la membrana (región basal/basolateral). En la fase muy tardía de la infección, las nucleocápsides son envueltas, en conjuntos (MNPVs) o individualmente (SNPVs), con membranas derivadas de la membrana nuclear. Finalmente, las nucleocápsides envueltas quedan atrapadas en la matriz pseudocristalina de poliedrina, constituyendo los cuerpos de oclusión (OB, poliedros de NPV). **B:** Para GVs el proceso es similar, excepto que no se distingue una zona nuclear clara ya que existe una desorganización del núcleo y allí es donde se completa el proceso. Los gránulos de GV formados por la Granulina, ocupan todo el volumen celular hacia el final de la infección. Tanto para NPVs como para los GVs, los cuerpos de oclusión se acumulan (en el **núcleo en los NPVs** o en el **citoplasma (o región nuclear desorganizada?) en los GVs**). La fase muy tardía y la acumulación de cuerpos de oclusión lleva a la apoptosis celular y su desorganización, produciéndose la liberación de los OBs. Con el fin de clarificar la interpretación del mecanismo, no se han respetado las proporciones correspondientes en algunos detalles.

Como evento final de esta etapa de infección se producen viriones ocluidos, su producción esta bajo el control de genes virales de expresión muy tardía (poliedrina ó granulina, p10, etc.) cuya expresión marca el inicio de este proceso de oclusión. En un estado de infección avanzada se pueden observar fácilmente los cuerpos de oclusión por medio de microscopía óptica con contraste de fase a partir de muestras de tejido graso o de hemolinfa. Avanzada la infección se produce la muerte del insecto y dependiendo de cómo fue la infección, lisis del tegumento con liberación de grandes cantidades de cuerpos de oclusión u OBs, que darán origen a un nuevo ciclo de infección.

Patogénesis

La patología causada por los Baculovirus es diferente según se este observando el efecto de infección de un NPV o de un GV y según sobre qué huésped ocurre la infección. Existe entre ellos, importantes diferencias en cuanto a grado de invasión, replicación, desarrollo y diseminación.

Nucleopoliedrovirus

Entre los NPVs, el baculovirus mejor estudiado y tomado como modelo es AcMNPV, *Autographa californica*, el cual ataca la mayoría de los tejidos de su huésped, replicándose particularmente bien en cuerpo graso, matriz traqueal y epidermis. En general, se puede decir que en lepidópteros se observa infección transitoria en el intestino medio sin producción de OBs para pasar luego a una infección generalizada tipo poliorganotrópica y formación de poliedros en el estado avanzado de la enfermedad. Para el resto de los órdenes que son infectados por NPVs, la replicación viral esta restringida al epitelio del intestino medio llegando a observarse incluso producción de cuerpos de oclusión sólo en el núcleo de estas células. (Federici, 1997; 1993).

En intestino medio, por experimentos de fluorescencia, se observó que la infección en un principio es localizada y que luego, aproximadamente a las 60 hs, va desapareciendo y al

cabo de este tiempo las células del intestino vuelven a aparecer sanas. Esto sugiere que la infección es transitoria y luego se dispersa. Lo mismo fue observado en el tejido traqueal.

En general los tejidos comprometidos, en un ciclo infeccioso de NPVs en larvas de lepidópteros, son varios e incluyen a: hemocitos, matriz traqueal, epidermis, cuerpo graso, tejido muscular, nervioso, reproductivo, glandular y células pericardiales. A nivel celular, se observan una serie de cambios durante el proceso infeccioso que tienen que ver en un principio con alteraciones del citoesqueleto, de microtubulos y sistemas membranosos (Volkman y Zaal, 1990). Todos estos estudios han sido realizados sobre células de cultivos celulares de la especie modelo de NPVs, AcMNPV, utilizando técnicas inmunohistoquímicas y microscopía electrónica. Al entrar las nucleocápsides al citoplasma, estas son transportadas al núcleo a través de una formación de microfilamentos, que según los estudios realizados la F-actina inmovilizada se une directa o indirectamente a la proteína mayoritaria de las nucleocápsides, la P39, y a un polipéptido de 67 kDa (Chalton y Volkman, 1991; Lanier *et al.*, 1996).

La liberación del DNA en el núcleo celular (Granados, 1978; Granados y Williams, 1986) se produce por acción de una proteína quinasa asociada a la envoltura viral y por fosforilación de la nucleoproteína P6.9 (Miller *et al.*, 1983). La microscopía electrónica muestra formación de estroma virogénico en la región central del núcleo y formación de nuevas nucleocápsides. Se comienza a ver que disminuye la transcripción de DNA y síntesis de proteínas de la célula huésped. El ensamblaje de las nucleocápsides ocurre por condensación del genoma viral en un complejo de nucleoproteínas en un proceso que esta mediado por la proteína de unión del DNA, la P6.9. También se observa un cambio en la morfología nucleolar por el aumento de la cantidad de RNA. Se ha visto relación entre la acción de genes virales tempranos, tardíos (Volkman y Zaal, 1990) y la hiperexpresión de la proteína P10 (Vlak *et al.*, 1988) con la involución de la membrana nuclear, aumento de la actividad metabólica celular y alteraciones en los microtúbulos (Williams y Faulkner, 1996, 1997). A partir de las 24 hs post infección (Volkman y Knudson, 1986) se ve el comienzo de la morfogénesis de los cuerpos de oclusión u OBs, por condensación de la poliedrina. Las células infectadas aumentan hasta 10 veces su tamaño original, con hipertrofia nuclear y acumulación de gran numero de poliedros en su interior (Figura I.12.A).

Al final del proceso infeccioso en larvas, se observa una característica coloración blanquecina de la hemolinfa como consecuencia de la acumulación de gran cantidad de OBs, que aparecerían en hemolinfa después de la lisis celular. Experimentos realizados *in vitro* demostraron que este último proceso depende de la acción de tres proteínas virales, la *p10* (Williams *et al.*, 1989; van Oers *et al.*, 1993, 1994), la *cathepsina* y una *proteína quinasa* (Williams y Faulkner, 1997; Lanier *et al.*, 1996).

Morfológicamente, se observa que el ciclo infeccioso termina con la muerte del insecto y rompimiento del tegumento larval que libera los OBs o poliedros al ambiente. En este proceso de licuefacción interviene una *quitinasa* que también es codificada por el virus (Hawtin *et al.*, 1995).

Granulovirus

Los estudios relacionados a patogénesis viral en GVs se han realizado solamente sobre insectos infectados, mediante análisis por microscopía óptica y electrónica. La información disponible es mucho menor que en el caso de los NPVs y uno de los motivos que provoca esta situación es la escasa y casi nula posibilidad de obtener líneas estables de cultivos celulares susceptibles a GVs.

En los granulovirus se ha observado que, en los estadios iniciales el proceso de infección en el huésped es muy similar al que ocurre en los NPVs que infectan lepidópteros, habiéndose encontrado mayores diferencias entre GVs y NPVs en el tipo de tropismo por tejidos, citopatología e histología.

En general se observa una infección transiente sin producción de cuerpos de oclusión y luego dependiendo del tipo de GVs que produce la infección se ve que la invasión puede ser en tejido graso (monoorganotrópica) o en tejido graso más el resto de los tejidos (poliorganotrópica). Los virus replican primero en núcleo y luego de la ruptura de la membrana nuclear replican también en citoplasma con producción de cuerpos de oclusión. Existe una única excepción a esta estrategia, el Granulovirus de *Harrisinia brillians*, HbGV, el cual replica y produce cuerpos de oclusión solamente en intestino medio, provocando una enfermedad aguda que provoca la muerte de larvas de tercer o cuarto estadio en 4 a 7 días. La citopatología observada en intestino medio es similar a la que ocurre en cuerpo graso y otros tejidos, mostrando una típica infección por GVs.

En la infección de tipo monorganotrópica, que se da por ejemplo en *TniGV* y otros GVs de *Noctuidos*, las larvas mantienen su apetito hasta 1 o 2 días antes de morir (8-12 días *post* infección), las larvas se tornan color blanquecino por el acumulo de OBs en el cuerpo graso. Al final de la infección y por no estar infectada la epidermis no se produce ruptura del tegumento, las larvas se tornan color negro debido a la invasión del cadáver por parte de microorganismos saprófitos que posteriormente desintegran la larva.

En la infección de tipo poliorganotrópica (*CpGV*, *PbGV* y *EpapGV*), la velocidad de acción de este tipo de virus es más rápida, las larvas mueren a los 5-6 días *post* infección, se produce licuefacción de los tejidos y la ruptura de los tejidos permite la liberación de los OBs. Similar a lo que ocurre en los NPVs, en este paso estaría involucrada una *quitinasa* que afecta el tegumento del insecto (Kang *et al.*, 1998). Los tejidos más afectados son cuerpo graso, epidermis y matriz traqueal, siendo este el mismo orden en que ocurre la secuencia temporal de infección con aparición de los OBs en los últimos tejidos

mencionados a partir de las 36-48 hs post infección. En CpGV se ha visto que el virus accede a la matriz traqueal por penetración directa vía traqueolas, desde las células del intestino medio o vía hemolinfa (Federico, 1997).

Este último tipo de GVs, cuenta con mayor potencial de utilización como agente de control biológico debido a su alta virulencia y mayor rendimiento de producción de cuerpos de oclusión.

El proceso infeccioso comienza como en NPVs (Figura I.11), una vez que las nucleocápsides han alcanzado la membrana nuclear, son inyectadas a través de los poros nucleares (Summers, 1971). Se observa que mientras el núcleo se agranda, va perdiendo definición (Figura I.12.B) y los nucleolos se van marginando y se va generando el estroma virogénico. A causa de la infección y producción de productos virales se detectan cambios metabólicos y citoplasmáticos, tales como la aparición de complejos membranosos que semejan a las cisternas del retículo endoplásmico rugoso que algunos autores suponen serían restos de componentes nucleares (Tanada y Leutenegger, 1968) o bien excesiva producción de membranas celulares (Walker *et al.*, 1982). La replicación comienza en núcleo pero luego al romperse la membrana nuclear se produce una mezcla de material nuclear y citoplasmático (Tweeten *et al.*, 1981; Tanada y Hess, 1991). Aquí comienzan a aparecer nuevas nucleocápsides que brotan a través de la membrana plasmática o del sistema traqueal y provocan la infección en el resto de los tejidos. En GVs no se ha detectado aun en los viriones brotantes un análogo de la GP64 observada en los NPVs aunque Luque *et al.* (1999) describieron para CpGV, un homólogo de secuencia de la Ld130 de *Lymantria dispar* cuya función sería similar a la de la GP64, pero su expresión y funcionalidad aun no ha sido determinada. Asimismo, para *EpapGV* se ha descrito la presencia y funcionalidad de dicho gen el cual ha sido llamado Epap-f (homólogo a Ld130 o p95, Goldberg *et al.*, 2002).

En larvas infectadas por GVs, la mayor parte de las nucleocápsides se conservan ocluidas en "vesículas" que emigran hacia la membrana basal, estas vesículas podrían estar involucradas en el transporte de nucleocápsides dentro del hemocoele del insecto (Granados y Williams, 1986; Hess y Falcon, 1987). Incluso en diversos tipos de granulovirus se han observado estas estructuras con gran cantidad de nucleocápsides alineadas paralelamente en su interior.

El rol del intestino medio de la larva en el proceso infeccioso no es actualmente bien definido para todos los GVs, si bien para CpGV se ha demostrado por microscopía electrónica que juega un rol importante en la generación de progenie infectiva, no se ha observado infección en intestino medio en otros GVs, o bien esta no es detectable por el uso de estas técnicas o bien la infección se produce en una región tan limitada que es muy difícil de detectar (Begon *et al.*, 1993).

También para los GVs y tal como sucede con los NPVs, durante el proceso de infección se producen cambios metabólicos en las larvas infectadas tales como aumento del peso larval, retraso del desarrollo larval, expansión de la vida de la larva e inhibición de la ecdisis o muda.

Biología molecular de los Baculovirus

La mayor parte de los conocimientos en biología molecular y celular de los Baculovirus, deriva de investigaciones realizadas en NPVs. La primera secuencia nucleotídica determinada de manera completa fue la del genoma del *Nucleopolyhedrovirus* de *Autographa californica* (AcMNPV), extensamente estudiado en diferentes planos desde los años 70, debido a la facilidad en su propagación en diferentes insectos huésped (es el baculovirus de mayor rango de huéspedes conocido) y líneas celulares. Este evento permitió una aceleración en el conocimiento de la complejidad de la organización genética y la detección de nuevos genes y funciones.

La expresión de genes virales parece estar regulada en forma de cascada y ocurre en tres fases: temprana, tardía y muy tardía (Figura I.13). Durante la fase temprana se expresan, entre otros, los genes requeridos para la replicación del DNA viral. La replicación del DNA viral es un paso obligado para el comienzo de la expresión génica tardía y muy tardía. En la fase tardía se producen proteínas virales estructurales que permiten el ensamblado y liberación al medio extracelular de viriones infectivos, mientras que la etapa muy tardía está dedicada a la producción de los cuerpos de oclusión.

Sobre el control de la expresión génica se han postulado dos alternativas posibles, en una se considera que el mecanismo más importante consiste en la regulación a nivel de inicio de la transcripción, es decir en la etapa de reconocimiento de los promotores. En la otra posibilidad también se especula sobre la regulación negativa (*downregulation*) de la transcripción de los mRNAs tempranos por los procesos de transcripción de genes tardíos; en particular, cuando los productos de transcripción corresponden a regiones parcialmente superpuestas pero de sentido opuesto (efecto de RNA *antisense*, Ooi & Miller, 1990) o a transcriptos tardíos que se inician *upstream* de transcriptos tempranos dando lugar a un efecto de ocultamiento del promotor temprano (Friesen & Miller, 1986).

Expresión de genes tempranos (utilización de la maquinaria celular)

Luego del desnudamiento, algunos genes del DNA viral son transcriptos por la RNA polimerasa II de la célula huésped. Por lo tanto, en esta etapa, la transcripción es sensible a la inhibición por α -amanitina (Figura I.13).

Los genes de transcripción temprana pueden subdividirse en dos clases, que difieren en sus promotores y *enhancers*. La transcripción de los genes tempranos inmediatos (*immediate early*) tales como *ie-1* no requiere proteínas virales adicionales ni elementos de *enhancers*, mientras que los tempranos retrasados (*delayed-early*) son transcritos a niveles basales en ausencia de factores virales, pero requieren de la unión del transactivador IE-1 a los *enhancers* para llegar a los niveles de expresión máximos (Pullen & Friesen, 1995a; Guarino & Smith, 1992; Guarino & Dong, 1991; Hoopes & Rohrmann, 1991).

Se identificaron, al menos, cuatro productos génicos virales que regulan la expresión temprana por transactivación de la transcripción: IE0, IE1, IE2 (IEN) y PE38/P34. Los experimentos *in vitro* muestran que IE1 de AcMNPV se une a las secuencias conocidas como *hr* (*homologous regions*), que contienen palíndromes imperfectos de unos 28 pares de bases repetidos y separados entre sí por 50-115 pares de bases. Algunos estudios mostraron que los elementos *hr* funcionan como *enhancers* transcripcionales y como orígenes de replicación.

Si bien la transcripción de los genes tempranos de baculovirus ocurre en el núcleo de la célula huésped mediante la participación de la RNA polimerasa II, el proceso de *splicing* no es común para los mRNAs de baculovirus. Solamente en el producto de transcripción del gen *ie0* se identificó el *splicing* de un intrón, responsable de la producción de un mRNA que se traduce a una proteína que contiene 54 aminoácidos extra en el extremo N de la secuencia de IE1 (Chisholm & Henner, 1988; Kovacs *et al.*, 1991a).

Transición de la fase temprana a la tardía (replicación del DNA)

El DNA desnudo resulta infeccioso, demostrándose que no se requiere ninguno de los componentes asociados con el virión maduro, pero es dependiente de la síntesis de proteínas codificadas por el virus (Burand *et al.*, 1980; Wang & Kelly, 1983; Lu & Miller, 1997).

Las proteínas responsables de la replicación del genoma viral se expresan en la etapa temprana de la infección. En células de *Spodoptera frugiperda* infectadas con AcMNPV la replicación se detecta a las 6 hs postinfección y continúa hasta alrededor de las 18 hs *postinfección*, declinando luego (Tjia *et al.* 1979) (Figura I.13).

Se han identificado elementos de secuencia nucleotídica que son requeridos *in cis* para una replicación eficiente del DNA viral que pueden funcionar como orígenes de replicación. Se trata de regiones homólogas con palíndromes imperfectos (*hrs*) y otro tipo de secuencias denominadas *non-hrs* (Kool *et al.*, 1995). Los orígenes de replicación *hrs* contienen grupos de 1 a 8 secuencias palindrómicas de unas 28 pb repetidas en forma dispersa en el genoma (Cochran & Faulkner, 1983) y también funcionan como *enhancers*

(Guarino & Summers, 1986). Los orígenes de replicación *non-hrs* son de estructura más compleja: contienen regiones ricas en AT, repeticiones directas y palíndromes no relacionados con los *hrs* (Kool *et al.*, 1994a; Pearson *et al.*, 1993; Heldens *et al.*, 1997).

La replicación del DNA parece ser un prerequisite para el comienzo de la expresión de genes tardíos de los baculovirus. Esto se apoya en la evidencia de que la inhibición de la replicación del DNA por aphidicolina también bloquea la transcripción este grupo de genes (Miller *et al.*, 1981; Rice & Miller, 1986). A diferencia de los genes de expresión temprana, los genes tardíos y muy tardíos son transcritos por una RNA polimerasa codificada por el virus y resistente a la α -amanitina (Grula *et al.*, 1981; Xu *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1991; Glocker *et al.*, 1993).

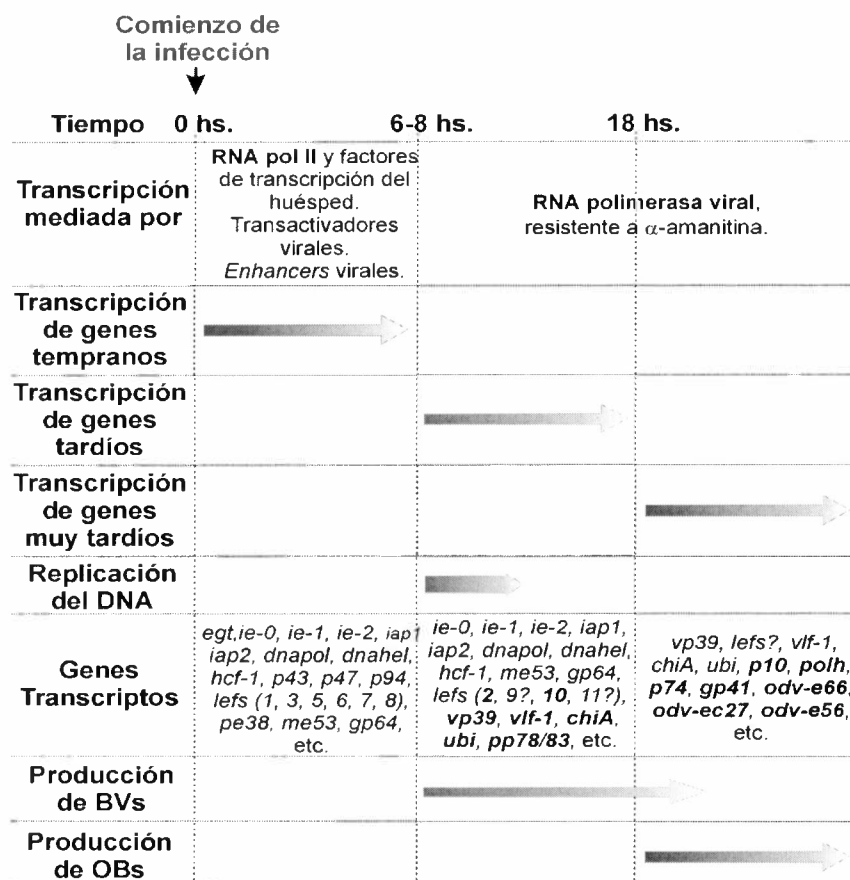


Figura I.13: Diagrama de los principales eventos transcripcionales relacionados con el ciclo viral. La expresión de genes virales parece estar regulada en forma de cascada y ocurre en tres fases: temprana, tardía y muy tardía. Durante la fase temprana se expresan, entre otros, los genes requeridos para la replicación del DNA viral y muchos de los transactivadores necesarios para la transcripción de los genes tardíos y muy tardíos. Por otra parte, la replicación del DNA viral es un paso necesario para el comienzo de la expresión génica tardía y muy tardía. En la fase tardía se producen, principalmente, proteínas virales estructurales y se ensamblan y liberan al medio extracelular viriones infectivos, mientras que en la etapa muy tardía se producen las proteínas necesarias para la generación de los cuerpos de oclusión. En el diagrama se mencionan algunos ejemplos de genes activos durante las distintas etapas. En las etapas tardía y muy tardía, se señalan en negrita algunos genes que se activan especialmente en la etapa respectiva. Esta figura sólo tiene una finalidad ilustrativa. En la realidad, las divisiones temporales no son tan definidas en las infecciones *in vivo*.

En experimentos de expresión transiente se ha identificado una serie de diecinueve productos génicos necesarios para la transcripción de genes tardíos en AcMNPV. De estos productos génicos denominados *lef* (*late expression factors*) una parte está relacionada con la replicación del DNA viral, mientras que el resto parece afectar la transcripción de los genes tardíos de una manera más directa (Todd *et al.*, 1995; Kool *et al.*, 1994b; Lu & Miller, 1995; Rapp *et al.*, 1998). Los genes *ie-1* (transactivación de genes tempranos), *ie-2* (transactivación de genes tempranos y bloqueo del ciclo celular), *lef-1* (DNA primasa?), *lef-2*, *lef-3*, *p143* (*dnahel*, *helicasa*), *dnapol* (DNA polimerasa), *p35* (inhibidor de caspasa), *pe38* y *lef-7* son requeridos para una replicación óptima de plásmidos dependientes de *hr* en células Sf-21. Algunos de estos productos génicos no son esenciales en diferentes líneas celulares (Rapp *et al.*, 1998; Kool *et al.*, 1994b; Kool *et al.*, 1993; Lu & Miller, 1995). En particular, la DNA polimerasa viral ha sido purificada y estudiada a nivel bioquímico (Hang & Guarino, 1999; McDougal & Guarino, 1999).

Por otra parte, más recientemente se han identificado genes adicionales que influyen sobre la expresión de genes tardíos (Li *et al.*, 1999). El requerimiento de todos estos genes surge de experimentos de replicación transientes, pero su delección en el genoma de *Bombyx mori* NPV ha permitido evaluar su real importancia *in vivo* (Gomi *et al.*, 1997). En esos experimentos se determinó que los genes *39K*, *ie-2*, *lef-7* y *p35* no son esenciales para la replicación viral, si bien es cierto que estas conclusiones son estrictamente válidas para el sistema particular de interacción virus-huésped (por ejemplo: como la infección con BmNPV no induce un efecto de apoptosis notable, el inhibidor de apoptosis *p35* no es esencial para la replicación viral).

Las subunidades de la RNA polimerasa viral, resistente a la α -amanitina, se encuentran codificadas por cuatro genes virales (*lef-8*, *lef-4*, *lef-9* y *p47*) que son esenciales para la transcripción de los genes tardíos y muy tardíos (Guarino *et al.*, 1998a; Guarino *et al.*, 1998b).

Además de los genes *lef*, se ha identificado un gen de expresión tardía denominado *vlf-1* (*very late factor 1*), que afecta específicamente la hiperexpresión de los genes muy tardíos *p10* y *polh* (poliedrina) interactuando con secuencias no codificantes (específicas de los genes muy tardíos) que se encuentran entre el elemento TAAG (común a los genes tardíos y muy tardíos) y el codón de iniciación de la traducción.

En la etapa tardía de la infección, simultáneamente con la replicación del DNA viral se observa una disminución en la síntesis de mRNAs celulares (Ooi & Miller, 1988). Asimismo, se ha demostrado una disminución de la síntesis de proteínas celulares luego de 6 horas postinfección y la total detención de la traducción de las mismas a las 24 horas del inicio de la infección con AcMNPV de células Sf9 (Carstens *et al.*, 1979; Wood, 1980).

Interacciones moleculares virus-huésped a nivel de organismo multicelular

Como se comentó previamente, además de productos génicos que interactúan con componentes celulares, los baculovirus codifican una serie de productos que funcionan a nivel de organismo y, de esta manera, alteran o manipulan la fisiología y estructura del animal infectado, entre los cuales cabe mencionar los genes para *quitinasa*, *cathepsina*, *vef* y *egt*.

Los productos de los genes virales *chiA* (*chitinase A*, quitinasa) y *cath* (*cathepsin*, catepsina) proveen las actividades enzimáticas necesarias para la liberación de la progenie de los OBs a partir de los cadáveres de las larvas infectadas y, de esta manera, facilitan la propagación del virus a nivel de poblaciones de insectos (Hawtin *et al.*, 1997). Posiblemente, la quitinasa que se encuentra asociada con la matriz proteica de los cuerpos de oclusión ayude a los baculovirus en el proceso de infección primaria, en el que los ODVs deben atravesar la membrana peritrófica, constituida, en parte por compuestos quitinosos. En este sentido, el producto del gen *chiA* (a diferencia de otras quitinasas) sería perfectamente activo en las condiciones alcalinas del intestino medio de las larvas de lepidópteros. Sin embargo, la delección del gen *chiA* en AcMNPV no causó efectos notorios sobre los parámetros de la infección DL_{50} (dosis letal 50%) y TL_{50} (tiempo letal 50%) en *Trichoplusia ni* (Hawtin *et al.*, 1997).

Estudios sobre el *enhancin* del virus de la granulosis de *Trichoplusia ni* (TnGV), indican que degrada proteínas de la membrana peritrófica del intestino medio y facilita el pasaje de virus desde el lumen del intestino medio a las células epiteliales del mismo (Derksen & Granados, 1988; Wang *et al.*, 1994; Wang & Granados, 1998). Los resultados más dramáticos se observaron en larvas de *T. ni* infectadas con AgMNPV en presencia de este mismo *enhancin*, donde la eficiencia de infección fue 16 veces mayor y el TL_{50} (tiempo letal 50%) se redujo en 55 hrs. (Corsaro *et al.*, 1993). Más recientemente, también se identificaron por primera vez dos genes *vef* en el genoma de un NPV (Bischoff & Slavicek, 1997; Kuzio *et al.*, 1999). La delección de ambos genes en el DNA de LdMNPV resulta en un AUMENTO de aproximadamente 1000 veces de la DL_{50} mientras que la inactivación de uno solo de los genes *vef* no tiene efecto sobre el fenotipo (Jim Slavicek comunicación personal).

Finalmente, el producto del gen *egt* (*ecdysteroid UDP-glucosyltransferase*) extiende el estado larval al inactivar los ecdisteroides del huésped, que actúan como hormonas que regulan la muda del insecto (O'Reilly *et al.*, 1997, 1992; O'Reilly & Miller, 1990; 1991; O'Reilly & Miller, 1989).

La comparación entre larvas infectadas con aislados silvestres o *wild type* de AcMNPV y con AcMNPV *egt*⁻ (se ha eliminado el gen *egt*), muestran que las larvas infectadas con el AcMNPV *egt*⁻, presentan una reducción significativa del peso, reducción del 40% en la

cantidad de alimento consumido y reducción en un 20% de la TL_{50} del virus (O'Reilly y Miller, 1991). En contrapartida, el número de poliedros producidos en las larvas se reduce en un 23%.

Es decir que, la modificación de la expresión y/o manipulación de estos genes virales nos pueden conducir a la obtención de Baculovirus más potentes en su acción bioinsecticida. En cierta forma estas son alternativas reales para superar los factores criticables que se le asignan a los baculovirus en su carácter de agentes insecticidas, tales como su velocidad de acción y su poder letal.

Baculovirus como Biocontroladores de Plagas agrícolas

En 1981, se desarrolló el primer formulado bioinsecticida en USA, que utilizó un Baculovirus como materia activa para la lucha contra *Helicoverpa zea*. Desde ese momento, se han comercializado alrededor de 20 nuevos productos que utilizan determinadas cepas de Baculovirus las cuales han sido muy efectivas contra algunas plagas tanto en los ecosistemas agrícolas (Moscardi, 1999) como forestales (Martignoni, 1984) (Tabla I.1). Su capacidad de producir epizootias y regular poblaciones de insectos, ha sido aprovechada como alternativa efectiva en programas de manejo integrado de plagas y en sustitución de insecticidas tóxicos de amplio espectro.

Cultivos	Insectos plaga	Virus usados	Registrado en
Manzana, pera, ciruela y nogal	<i>Cydia pomonella</i>	CpGV	Argentina, UE, USA,
Col, tomate y algodón	<i>Plutella xylostella</i> , <i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Phthorimaea operculella</i> y <i>Endopiza viteana</i>	PxyGV, PhopGV, HearNPV..	UE, Israel, Africa, Asia
Algodón, maíz y tomate	<i>Spodoptera littoralis</i>	SlitNPV	UE, Africa
Algodón y hortalizas	<i>Helicoverpa zea</i> y <i>Heliothis virescens</i>	HzeaNPV	USA
Hortalizas y flores	<i>Spodoptera exigua</i>	SeNPV	USA, UE
Hortalizas	<i>Anagrapha falcifera</i>	AfaNPV.	USA
Alfalfa y otros cultivos	<i>Autographa californica</i> <i>Anticarsia gemmatilis</i>	AcMNPV, AgMNPV	USA, Brasil
Especies forestales	<i>Orgyia pseudotsugata</i>	OpNPV	USA, Canadá
Especies forestales	<i>Lymantria dispar</i>	LdNPV	USA, Canadá, UE

Tabla I.1: Baculovirus Registrados como insecticidas, En la siguiente tabla se describen los productos bioinsecticidas formulados sobre la base de baculovirus, país en que se ha obtenido registro de comercialización, los insectos hospederos y los cultivos atacados por dichas plagas (Tabla propia modificada de www.iicasaninet.net, 2002)

Entre los *Nucleopoliedrovirus* el más utilizado es el de *Anticarsia gemmatilis* (AgMNPV), aplicado anualmente en Brasil en casi dos millones de hectáreas de soja para el control de la “oruga de las leguminosas” (Moscardi, 1999; Moscardi, 2002).

Respecto a los *Granulovirus*, el que ha alcanzado mayor difusión ha sido el de *Cydia pomonella*, con varias marcas comerciales y registrado para el control de la oruga de la pera y la manzana en cultivos orgánicos de Europa, Australia, EE.UU. En nuestro país, una formulación a base de este virus (denominada Carpovirus) fue desarrollada por el IMYZA-INTA (Castelar), constituyéndose en el primer baculovirus que cuenta con registro de uso comercial ante SENASA.

El uso de Baculovirus como agentes de control biológico no ha alcanzado la difusión esperada debido a que tanto la industria como el productor agropecuario, están acostumbrados a la rápida acción de los insecticidas químicos de amplio espectro y gran poder de volteo a lo que se suma los bajos costos de producción y obtención de los mismos. En tal sentido los Baculovirus presentan la desventaja de poseer una baja velocidad de acción y un estrecho rango de huésped. (Moscardi y Carvalho, 1992). Por último, la producción sobre larvas del huésped requiere de un estricto control de calidad tanto de la cría de insectos como del inóculo, factor que no se ha tenido en cuenta en ciertos programas de producción y aplicación de baculovirus.

A pesar de las inconvenientes que presenta usar mecanismos biológicos de control, existe una gran demanda de implementación de este tipo de agentes de control que sean efectivos a escala mundial para el diseño de paquetes tecnológicos de manejo integrado de plagas (MIP) y que a su vez que permitan mantener por debajo de los niveles de daño económico a las plagas secundarias no blanco (non-target) y las plagas principales en los refugios de plantas no transgénicas. En este sentido, los baculovirus se consideran excelentes candidatos para tales programas de MIP, como así también para ser empleados en la producción de cultivos orgánicos.

Baculovirus genéticamente modificados

Para disminuir las desventajas que presentan los baculovirus como agentes de control biológico (básicamente, pequeño rango de huéspedes y baja velocidad de acción) se ha contemplado la posibilidad de modificarlos genéticamente. En principio, se podrían considerar dos tipos de modificaciones, por un lado disminuir su especificidad ó ampliar su rango de huéspedes y por el otro modificar los factores que afectan a la eficacia insecticida del virus.

La primera modificación del genoma que realizó Smith *et al.*, en 1983 es lo que permitió el desarrollo de baculovirus recombinantes, tales recombinaciones han reportado múltiples beneficios tanto para la producción de proteínas recombinantes muy útiles para la industria

farmacéutica como el desarrollo de agentes de control biológico (Miller *et al.*, 1983; Miller, 1998)

Aunque estos no se encuentran registrados para su uso comercial como los anteriormente descritos, actualmente se cuenta con gran cantidad de baculovirus modificados o recombinantes, en los cuales la modificación siempre tiende a mejorar la capacidad bioinsecticida del virus *wildtype*.

Las modificaciones pueden consistir en la eliminación de genes (como es el caso de los virus *egt* -) o bien en la inserción de genes (como es el caso del agregado de genes que codifican para toxinas, hormonas, etc). Por el momento estos baculovirus recombinantes han sido probados sólo a escala de laboratorio y en pequeños ensayos de campo (Tabla I.2).

Virus	Modificación genética	Ensayos Laboratorio		Ensayos de campo (uso experimental)
		HUESPED	% REDUCCION LT50	
AcMNPV	Delección de genes			
	Δegt	<i>T. ni</i> <i>S. frugiperda</i>	25-30% 30%	EE.UU.
AgMNPV	Δegt	<i>A. gemmatilis</i>	30%	
SpliNPV	Δegt	<i>S. littoralis</i>	23%	
LdMNPV	Δegt	<i>L. dispar</i>	15-20%	EE.UU. (forestales)
AcMNPV	Inserción de genes			
	Hormona Juvenil (JHE)	<i>T. ni</i>	30%	
	Toxina de <i>Androctonus australis</i> (AaIT)	<i>T. ni</i> <i>H. virescens</i> , <i>H. zea</i>	20-30% 22-36%	Inglaterra (<i>T. ni</i> en repollo) EE.UU. (<i>Heliothis</i> spp. en algodón, repollo, lechuga y tabaco)
	Toxina de <i>Leirus quinquestratus lebraeus</i> (LqhlT2)	<i>T. ni</i> <i>S. exigua</i> <i>H. armigera</i>	50-56% 37-47% 24-32%	
	Toxina de <i>Pyemotes tritici</i> (TxP-I)	<i>T. ni</i> <i>S. frugiperda</i>	25-53% 39-59%	
	Toxina de <i>Anemonia sulcata</i> toxin (AsII)	<i>T. ni</i>	38%	
HzSNPV	LqhlT2	+	+	EE.UU. (<i>Heliothis</i> spp. en algodón)
BmNPV	Hormona Diurética (DH5) AaIT	<i>B. mori</i> <i>B. mori</i>	20% 40%	
HearNPV	Delección/Inserción Δegt / <i>Androctonus australis</i> toxin (AaIT)	<i>H. armigera</i>	32%	
HzSNPV	Δegt / <i>Pyemotes tritici</i> toxin (TxP-I)	<i>H. zea</i>	35-47%	EE.UU. (<i>Heliothis</i> spp. en algodón, repollo, lechuga y tabaco)

Tabla I.2: Ensayo de la capacidad bioinsecticida de Baculovirus recombinantes. Aquí se detallan las modificaciones (inserción /delección) realizadas sobre los diferentes Baculovirus y los resultados obtenidos sobre el huésped.

Granulovirus de *Epinotia aporema* (EpapGV)

Epinotia aporema o “barrenador de los brotes”, es una de las plagas más importante de la soja en nuestro país. Produce daños económicamente significativos debido a que se alimenta y barrena principalmente la plántula o brote de la soja, aunque puede atacar al cultivo en diferentes etapas del proceso de maduración.

En 1982 en Chile, se colectaron por primera vez larvas muertas de *E. aporema* con signos característicos de una infección viral (Ripa, 1982). Estudios realizados por microscopía óptica permitieron detectar cuerpos de inclusión en tejidos infectados de esas larvas y asociar la patología observada a un Baculovirus (Figura I. 14. A).

Recién en 1989, en Argentina (Oliveros, Santa Fe), se aisló el primer granulovirus de la larva *E. aporema* el cual fue designado EpapGV. Los cambios morfológicos típicos de la infección causada por este virus pudieron observarse en un gran número de larvas muertas indicando que EpapGV es un virus altamente patogénico (Díaz y Diez, 1989) (Figura I.14. A y I. 14. B).

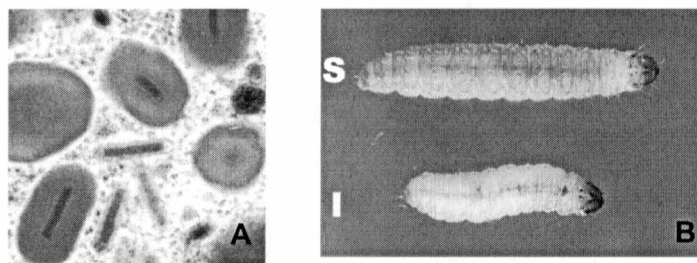


Figura I.14: Control de *E. aporema*. A: Corte de tejido de *Epinotia aporema* infectado por EpapGV, donde se muestran nucleocápsides ocluidas y no ocluidas de EpapGV. B: Larva de *Epinotia aporema* en tercer estadio, S- larva sana. I- larva en un estado avanzado de infección con el virus de la granulosis EpapGV. La larva infectada sufre retraso en su crecimiento por la infección con EpapGV, presentando un color blanquecino debido a la acumulación de gránulos en el tejido adiposo y en su epidermis.

En Brasil, ensayos preliminares realizados en condiciones de laboratorio sobre el aislamiento argentino de EpapGV, mostraron que este granulovirus posee gran potencialidad de uso como bioinsecticida en áreas con alta incidencia de la plaga (Moscardi y Sosa Gomez, 1992). Sin embargo, los estudios fueron suspendidos debido a la falta de una metodología de cría artificial adecuada para la multiplicación masiva del virus en el huésped original (Ripa, comunicación personal).

En 1996 se inició el proyecto multidisciplinario “Caracterización de un Virus de la Granulosis y desarrollo de un insecticida para el control biológico de *Epinotia aporema*”. En una efectiva colaboración entre el IBBM (Fac. de Cs. Exactas, UNLP) y del IMYZA – INTA (Castelar) se inició la caracterización morfológica, bioquímica y biológica de EpapGV (Figura I.D; Sciocco-Cap et al., 2001).

Para alcanzar los objetivos de este proyecto se debieron abordar diferentes aspectos tales como, puesta a punto de un método de cría de *Epinotia aporema* en el laboratorio e identificación de factores de virulencia y patogenicidad, análisis del rol de los mismos en las distintas etapas de la infección viral, desarrollo de formulaciones efectivas para el control de la plagas y diseño de metodologías adecuadas para el control de la calidad de dichas formulaciones.

En mi trabajo de Tesis he abordado principalmente el estudio de los factores virales asociados a la virulencia y patogenicidad del mismo, específicamente he estudiado al gen *egt* y a su producto codificado, la enzima EGT. La elección de este gen se basó fundamentalmente en dos aspectos:

- 1) La observación de un retraso en la muda de la larva de *E. aporema* infectada con EpapGV.
- 2) La similitud de estas observaciones con otras informadas para infecciones virales producidas por NPVs, las cuales han sido asociadas a la presencia del gen *egt*.

Cabe mencionar que al momento de iniciar este trabajo, no se había descrito la presencia del gen *egt* en Granulovirus, por lo que en como primer etapa se propuso la búsqueda de un análogo de este gen en EpapGV.

A continuación se detallan los objetivos generales y particulares de este trabajo tesis

Objetivo general de la Tesis

Clonado molecular del genoma del virus de la granulosis de *Epinotia aporema*, EpapGV, y caracterización del gen de la ecdisona glicosiltransferasa (*egt*).

Objetivos particulares

- Construcción de una genoteca del DNA de EpapGV.
- Identificación y estudio biológico molecular del gen *egt* de EpapGV
- Contribución a la construcción del mapa físico del virus y ubicación del gen de *granulina*.
- Identificación y estudio molecular de genes de helicasas.
- Contribución a la búsqueda y detección de otros genes de importancia: Epap-f (homólogo de Ld130 ó p95, posible proteína fusogénica), *DNA pol* e *i.early*.
- Desarrollo de un sistema de control de calidad de la producción del bioinsecticida viral formulado.

CAPÍTULO II

Bibliotecas Genómicas de EpapGV

Capítulo II: Bibliotecas genómicas de EpapGV

INTRODUCCION

La mayoría de los integrantes de la familia *Baculoviridae* se han aislado de insectos. Así, los *Granulovirus* que constituyen un grupo minoritario dentro de dicha familia han sido aislados de más de 100 especies, todas ellas pertenecientes al orden *Lepidoptera* de la clase *Insecta* (Volkman *et al.*, 1995). En el último informe de ICTV (Blissard *et al.*, 2000), se clasificaron solo cinco especies del género y una variante, eliminando del informe anterior los aislamientos que no habían sido suficientemente caracterizados.

En 1996, al comienzo de este trabajo de tesis, sólo habían sido caracterizado cuatro GVs a nivel biológico-morfológico (*Cydia pomonella* GV, 1981; *Pieris rapae* GV, 1987; *Xestia c-nigrum* GV, 1992 y *Cryptophlebia leucotreta* GV, 1992). A partir de ese año también comenzaban a informarse los aspectos moleculares más relevantes de los mismos, tales como la determinación de los mapas físicos de los genomas y el mapeo del gen de *granulina*.

A continuación haré una breve descripción de los datos más relevantes de este grupo.

Características genómicas y moleculares de los Granulovirus (GVs)

De acuerdo al ICTV, se ha asignado a cada virus el nombre del huésped del cuál fue aislado por primera vez. Si bien esta posición es discutida debido a la existencia de diferentes huéspedes para un mismo virus, actualmente se mantiene esta norma para denominar a cada aislamiento.

La mayoría de los aislamientos de GVs han sido identificados por su morfología y patrón de infección, aunque estas características no presentan una gran variedad y no son suficientes para hacer una correcta caracterización. En particular, la homogeneidad que se observa entre los OBs de los diferentes GVs, no permite usar esta característica para diferenciar entre los diferentes virus del género.

Dada la similitud morfológica, la diferenciación precisa entre los diferentes GVs debe fundarse en una caracterización desde puntos de vista complementarios que incluyan estudios bioquímicos, estructurales y biológicos. Para ello, se realizan análisis de proteínas estructurales y/o serología, histopatología, morfogénesis y análisis del DNA genómico viral.

Del estudio de proteínas estructurales empleando el método de SDS-PAGE (Laemmli, 1970), se ha podido determinar que los viriones de los baculovirus poseen entre 15-30 proteínas estructurales y una de ellas es mayoritaria. Las diferencias entre proteínas de GVs y NPVs son mínimas por lo que también tienen un valor limitado para ser usadas como característica diferencial. Para el caso específico de nuestro virus, EpapGV, en el análisis por SDS-PAGE, presenta una banda proteica mayoritaria de aproximadamente

28.5 kDa (Sciocco *et al.*, 2001) tal como se ha descrito para el resto de las granulinas conocidas (27 a 31 kDa; Rohrmann, 1992; Tweeten *et al.*, 1981).

Los avances en los estudios detallados de histopatología y morfogénesis han aportado mucha información sobre ciclos de infección en los NPVs. Para los GVs, a diferencia de lo que ocurrió con los NPVs, estos estudios se han visto limitados por la ausencia de líneas celulares susceptibles.

Debido a las limitaciones que presentan los dos factores anteriormente comentados, el método más apropiado para identificar un baculovirus es el análisis del DNA genómico viral, y que además permite complementar a los anteriores. Las ventajas que ofrece el método son su rapidez y precisión.

El estudio se basa en la generación de patrones característicos de fragmentos obtenidos por digestión con enzimas de restricción (ER) seleccionadas. Los fragmentos generados se nombran asignándole letras que corresponden por orden alfabético a tamaños decrecientes (A, B, C,..., etc). Cada enzima de restricción genera un perfil de restricción específico para cada virus, permitiendo hacer una clara diferenciación entre diferentes virus y entre diferentes aislamientos o genotipos de un mismo virus (Crook *et al.*, 1981. Zeddami *et al.*, 1999; Smith y Crook, 1988; Muñoz *et al.*, 1998, 1999).

Estos datos permiten, además, estimar el tamaño del genoma viral con mayor precisión y determinar el mapa físico del mismo. El rango de tamaños para los genomas de los diferentes GVs aislados hasta la actualidad es entre 90.5 kpb para *Erinnyis ello* GV (Finnerty *et al.*, 2000) y 179 kbp for *Xestia c-nigrum* GV (XcGV; Goto *et al.*, 1992). Asimismo, el clonado de los fragmentos genómicos virales facilita y amplía este tipo de análisis permitiendo refinar los estudios para obtener mapas detallados de sitios de restricción.

El primer mapa físico descrito en la Familia *Baculoviridae* fue el de *AcMNPV* (Smith y Summers, 1979; Miller y Dawes, 1979) y el primero descrito para un Granulovirus fue el de *Pieris rapae* GV (PrGV, Dwyer & Granados, 1987). Dado que el DNA de los Baculovirus es circular cerrado, Vlak y Smith propusieron en 1982, que se tomara como punto cero del mapa físico el sitio de restricción más cercano al extremo 5' del gen que codifica para la proteína mayoritaria de los OBs, *poliedrina* o *granulina*. Asimismo, la representación gráfica puede ser lineal o circular.

Al momento de iniciar este trabajo de tesis había muy poca información sobre los GVs a nivel molecular. Para los granulovirus, *Pieris rapae* GV (PrGV, Dwyer & Granados, 1987), *Cryptophlebia leucotreta* GV (ClGV, Jehle *et al.*, 1992), *Trichoplusia ni* GV (TnGV; Hashimoto *et al.*, 1996) sólo se habían descrito la construcción del mapa físico. Los estudios moleculares avanzaron con los años hacia el mapeo de los genes más relevantes (*granulina*, *egt*, etc).

Recién, a partir del año 1999 se comenzó con el secuenciamento de genomas de GVs, actualmente existe información de cuatro genomas de GVs completamente secuenciados:

XcGV (Hayakawa *et al.*, 1999), *Plutella xylostella* GV (PxGV, Hashimoto *et al.*, 2000), *Cydia pomonella* GV (CpGV; Luque *et al.*, 2001) y *Phthorimaea operculella* (PhopGV; Croizier *et al.*, 2002), siendo CpGV la especie modelo del grupo *Granulovirus*. Asimismo se han presentado resultados sobre el ordenamiento relativo de varios genes relevantes de la zona *upstream* y *downstream* al gen de *granulina* (AoGV; Wormleaton & Winstanley, 2001).

La posibilidad de llegar a utilizar al virus de la granulosis *EpapGV* como un bioinsecticida para el control de la plaga *Epinotia aporema*, condujo al estudio detallado de este virus desde el punto de vista molecular y biológico (patogenicidad, virulencia y espectro de huéspedes).

En nuestro laboratorio, se iniciaron los estudios moleculares comenzando por el análisis del DNA de *EpapGV* con enzimas de restricción. Luego se decidió la construcción de bibliotecas genómicas, esto permitió extender la caracterización molecular del virus y continuar el resto de los estudios genómicos que se iniciarían en este y otros trabajos de tesis.

Debido a la ausencia de líneas celulares y para facilitar la amplificación del DNA viral, la construcción de las bibliotecas fue una contribución que permitió mantener el DNA de *EpapGV* de manera fácilmente accesible. Este recurso también aumenta la posibilidad de poder obtener la secuencia completa del genoma de *EpapGV*.

MATERIALES Y MÉTODOS

II.1) Aislamiento y Purificación de Viriones de EpapGV

Para el aislamiento de *EpapGV*, primeramente hubo que partir del establecimiento en el laboratorio de una colonia de *Epinotia aporema* y de un método de cría sobre medio artificial (Greene *et al.*, 1976 modificada). Las larvas fueron alimentadas con esta dieta en recipientes plásticos de 1 litro de capacidad. Los adultos fueron manejados en jaulas de oviposición con suplemento de miel al 10% como sustrato de alimentación y un fotoperíodo de 14:10 horas L:O.

EpapGV fué aislado de una única larva de *E. aporema* que fue colectada en Oliveros (Santa Fé). La amplificación viral fué llevada a cabo sobre larvas de último estadio alimentadas con una dieta artificial libre de formalina y superficialmente contaminada con 4000 gránulos de *EpapGV* por mm² (Sciocco *et al.*, 2001).

Para purificar gránulos se trituraron las larvas muertas en buffer TE, se filtró el homogenado por gasa, para separar cutícula y restos mayores de insectos. Luego se separaron los gránulos virales de los restos menores por medio de múltiples centrifugaciones diferenciales, estos gránulos sedimentados se "disolvieron" en una solución de NaCO₃ 0.1M, pH 10.5 / EDTA 0.01M / NaCl 0.17M durante 30 minutos a 37°C. Este clarificado se neutralizó a pH 7 y se sedimentaron los viriones por centrifugación en rotor SW 41 Ti a 100000g durante 60 minutos. Los viriones así preparados fueron usados en las siguientes etapas. A partir de la disolución alcalina de los gránulos, todos los pasos se realizaron en frío.

Alternativamente, según las necesidades de pureza de gránulos que se requiera, se puede incluir una ó dos purificaciones en gradiente continuo de sacarosa 25%-65%.

II.2) Extracción de DNA viral

Para extraer DNA viral se trata a los viriones purificados durante 90 minutos con Proteinasa K (0.5mg/ml). Luego se realiza una extracción con un volumen de fenol, luego fenol-cloroformo-isoamílico y finalmente cloroformo-isoamílico. El sobrenadante, conteniendo el DNA, se precipita con AcNa 0.3M y un volumen de isopropanol. El DNA se resuspende suavemente en agua o TE a 60 °C, evitando la agitación violenta para minimizar el daño mecánico. La cuantificación y pureza del DNA se determinaron por medidas de absorbancia a 260/280 de longitud de onda.

II.3) Digestión con enzimas de restricción del DNA viral

El DNA extraído según se ha descripto fue tratado por separado con cuatro enzimas de restricción, siguiendo las recomendaciones del fabricante de cada enzima. Los fragmentos de restricción obtenidos después de la digestión del DNA con las enzimas *BamHI*, *BglII*,

EcoRI, y *HindIII* fueron resueltos en geles de agarosa 0.4 y 1.5% (P/V) teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml). La imagen de los geles fue captada y fotografiada bajo luz UV.

II.4) Ligación del DNA viral al vector pZErO™ 2

Como vector de ligación se usó el plásmido pZErO™-2 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este sistema conocido como *pZErO background*, se basa en contener el gen letal de *E.coli*: *ccdB* (Bernard et al., 1994). El vector contiene un sitio múltiple de clonado con 18 sitios de restricción que permiten clonar extremos romos o cohesivos. El marcador de selección en *E.coli*, es el gen de resistencia a Kanamicina. Flanqueando el *polylinker* se encuentran el origen de replicación f1, promotores para transcripción *in vitro* Sp6 y T7 y también sitios para todos los *primers* de M13. Con este plásmido se utilizó la cepa *E.coli* TOP10, recomendada para trabajar con este sistema ya que no contiene al gen *lacI^q*, de esta manera el gen *ccdB* se expresará constitutivamente sin que haga falta una inducción con IPTG. Este sistema permite eficiencias de clonado muy alta (~95%).

En este trabajo se optó por la ligación del conjunto de fragmentos generados por digestión en un único evento de ligación, en lugar de aislar previamente cada uno de los fragmentos individuales. Para ello, se realizó la digestión del DNA de EpapGV y de *pZErO* con la enzima de restricción seleccionada. Se digirieron de 2 µg -4 µg de DNA de EpapGV, con 10 U de la enzima seleccionada, en el buffer recomendado durante 1 hora y se analizó una alícuota (70%) de la digestión por electroforesis en gel de agarosa. La digestión del vector se realizó en las mismas condiciones partiendo de 0.5 µg -1 µg de vector.

El experimento de ligación se realizó utilizando 10-20 ng del vector digerido y aproximadamente 400 ng del DNA viral digerido con la misma enzima, en presencia de T4-ligasa (3U/µl, Promega) y buffer de ligación durante 30 minutos a 16 °C para el caso de enzimas que dejen extremos cohesivos y de 1 hora para las que dejen extremos romos.

II.5) Transformación de células con DNA viral ligado al vector pZErO™ 2

Mediante la transformación de una célula huésped con 5 µl del producto de ligación obtenido anteriormente fue posible obtener y aislar los clones recombinantes buscados. En este trabajo todas las transformaciones se realizaron por electroporación. Las bacterias se sometieron a un campo eléctrico que le crea poros transitorios en su membrana y permite el ingreso de material externo.

Primero se mezclaron las bacterias descongeladas y una alícuota de la reacción de ligación, este paso se realizó con incubación permanente en agua-hielo. Luego esta mezcla se colocó en una cubeta de electroporación pre-efriada y se ubicó en el electroporador. Las condiciones de capacitancia y campo eléctrico, en el GEN-PULSER de Bio-Rad fueron 25 µF y 2.2 kV; el pulse controller: 200 ohm. Las bacterias se resuspendieron en 500 µl de medio LB sin antibiótico y se incubaron a 37°C durante 1 hora

con agitación. Luego una alícuota de 300 μ l se plaqueó sobre placas de LB-agar con kanamicina.

II.6) Análisis y selección de los clones recombinantes de EpapGV

Debido al tipo de estrategia de ligación que se usó en la generación de las bibliotecas, fue necesario buscar un método rápido para realizar el análisis de los clones recombinantes que se obtenían del paso anterior.

Como primer paso se utilizó la técnica de Eckhardt (Eckhardt T, 1978) para lograr agrupar clones de tamaño similar y disminuir el número de clones recombinantes a analizar. Con la técnica de Eckhardt, se logran diferenciar los plásmidos por tamaño, ya que a diferentes tamaños, diferente velocidad de migración, con esta técnica se logró diferenciar plásmidos que diferían en solo 100 pb.

Brevemente, se realizó la lisis de la bacteria *in situ* en la fosa del gel y luego por medio de la aplicación de un voltaje muy bajo se logró que el plásmido recombinante se introduzca en la trama del gel separándose de los restos celulares que quedan retenidos en la fosa. Al final de la corrida, los plásmidos se han separado y esto permite separarlos y agruparlos según la movilidad, que siempre debe ser menor a la del plásmido control (ó plásmido sin inserto). En principio se puede suponer que las muestras que han migrado la misma distancia es porque son plásmidos que llevan insertos de un mismo tamaño. El método se realizó disolviendo una colonia en 10 μ l de TBE 1X, a esto se le adicionaron 15 μ l de Solución [E₁F + RNasa (10 % V_t) + Lisozima (pizca)]. La solución E₁F contiene: Sacarosa 8 %, Ficoll 2 %, Tris 50 mM, EDTA 25 mM, pH 8.5. Se preparó una *premix* de acuerdo al número total de colonias a analizar. Se mezcló y se sembraron 15 μ l (rápidamente) en el gel de agarosa 0.8 % + SDS 0.1 %. Las muestras se desarrollaron a 20 V durante 15 minutos hasta que las fosas se observaron claras, a partir de ese momento, el voltaje se aumenta a 90 V hasta que el colorante haya avanzado hasta más de la mitad del gel. El colorante se agregó a solo una muestra y sirvió como referencia.

Para la tinción del gel, primero se eliminaron los restos del buffer TBE/SDS con agua y se luego se sumergió el gel en BrEt durante 5 minutos con agitación suave (conc: 0.5 μ g/ml). Se miró bajo luz U.V. y se observó la diferencia de migración entre el plásmido control (sin inserto) y aquellos que tienen inserto.

A continuación del Eckhardt, el tamaño de los plásmidos seleccionados fue verificado realizando la purificación de los plásmidos y digestión con la/s enzimas adecuadas que permitan liberar el/los inserto y corroborar los tamaños.

II.7) Purificación de los clones recombinantes de EpapGV

Los clones recombinantes seleccionados para ser analizados se amplificaron y purificaron por el método de lisis alcalina de Birnboim & Doli., 1979. De esta manera se purificaron al menos tres clones por cada inserto clonado, en cada una de las genotecas generadas. Los

insertos fueron liberados del vector para determinar su tamaño, por medio de enzimas de restricción. Los insertos de las genotecas *Bam*HI, *Eco*RI y *Hind*III fueron liberados con las respectivas enzimas y los que pertenecen a la genoteca de *Bgl*II fueron **linealizados** con *Bgl*II (sitio de restricción que posee pZErO, fuera del *polylinker*) o **liberados** con enzimas flanqueantes del *polylinker* de pZErO. Especialmente para el caso de esta enzima, los fragmentos de restricción de *Bgl*II se insertan en *Bam*HI, pero se liberan con enzimas flanqueantes ya que el sitio *Bgl*II no se regenera.

II.8) Identidad de los clones recombinantes de *EpapGV*

Este experimento se realizó con la totalidad de los clones que fueron obtenidos en cada una de las genotecas, para tener la certeza de que se estuviera trabajando siempre con clones que contuvieran solamente DNA de *EpapGV*. La identidad de los clones obtenidos se confirmó mediante la técnica de hibridación sobre un *Southern-blot*, utilizando como sonda al DNA total de *EpapGV*.

El sistema de marcación elegido fue el radiactivo, por su alta sensibilidad, utilizando ^{32}P que se incorporó al DNA de *EpapGV* mediante la técnica de *multipriming* usando *random primers* (Sambrook *et al.*, 1989). Estos fragmentos en presencia del fragmento mayor de la DNA pol I (*Klenow*) y $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ dan origen a la sonda marcada.

Para ello se desnaturizó el DNA molde por calentamiento a 100 °C por 3 min, en presencia de una mezcla de hexanucleótidos (pdN₆) con secuencias al azar (*random primers*). A continuación, se enfrió la mezcla en agua-hielo (0 °C) para permitir el apareamiento de los *primers* con el molde y luego, se agregaron los dNTPs, la enzima y su buffer específico (Tris-HCl 50mM pH 7,5; NaCl 50mM; MgCl₂ 10mM; DTT 5mM), de acuerdo al siguiente protocolo que se detalla abajo.

La reacción se incubó a 37 °C durante 3 hs para permitir la extensión de los *primers* y se detuvo con el agregado de EDTA (20 mM final). Posteriormente, la mezcla de reacción fue diluida a 100 µl y las sondas radioactivas se purificaron por cromatografía de exclusión molecular para eliminar el exceso de los dNTPs.

DNA (100ng/µl)	10,0 µl
pdN ₆ (100ng/µl)	5,0 µl
Agua (csp 50 µl)	10,5 µl
buffer 10X	5,0 µl
3 dNTPs -dATP(1mM de c/u)	1,0 µl
$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (20 µCi/µl)	17,5 µl
Klenow (5 U/µl)	1,0 µl

La purificación se realizó por cromatografía en una columna conteniendo 1 ml de Sephadex G-50 (*Nick columns*TM, Pharmacia, Upsala, Suecia) y la elución de las mismas se realizó con una solución de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8).

II.9) *Southern-blot* de las genotecas de EpapGV

El DNA de los plásmidos recombinantes fué digerido con las enzimas de restricción necesarias para liberar los insertos, excepto en el caso de insertos *Bgl* II en el cuál se utilizaron las enzimas del *polylinker* flanqueantes al sitio *Bgl* II, *Eco*RI y *Hind*III. El DNA de *EpapGV* digerido con la enzima de restricción correspondiente fue resuelto junto a los DNAs de cada una de las genotecas, en geles de agarosa al 0.8 %, teñidos con Bromuro de etidio (Br Et) a voltaje constante no mayor a 3 V/cm. El DNA de *EpapGV* también sirvió como control positivo en los experimentos de hibridación.

Los geles fueron tratados de la siguiente manera para realizar la transferencia a una membrana de nylon, primero fueron sumergidos en solución de depurinación (0.2 N de HCl) durante 10 minutos, lavados con agua bidestilada, e incubados durante 30 minutos con solución de desnaturalización (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl), 30 minutos en solución de neutralización (1.0 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl) y finalmente, 30 minutos en solución de transferencia (10 X SSC) El gel fue transferido a la membrana de nylon Zeta *probe* (BioRad) empleando vacío. El material transferido y envuelto en una película de polietileno fué fijado por irradiación con luz UV durante 5 minutos en el transiluminador Fotodyne.

Las membranas fueron incubadas en solución de prehibridación (5 X Denhardt 6X SSC, 0.1 % SDS, 0.5 M Tris pH 7.4-7.5, 200 µg/ml de RNA de levadura) durante 2 hs a 65 °C. La hibridación se realizó por agregado de la sonda marcada a la solución de prehibridación e incubación a la misma temperatura de prehibridación durante 18 hs. Finalizada la hibridación la membrana fue lavada 3 veces con solución de lavado 6X SSC-0.1% SDS durante 5 minutos cada vez, luego 3 veces con solución de lavado 2X-SSC-0.1% SDS. Las membranas lavadas fueron expuestas a placas autorradiográficas Kodak^R durante un mínimo de 12 hs.

II.10) *Colony-blot* de las genotecas de EpapGV

En algunas ocasiones la identidad de los clones recombinantes se determinó directamente por hibridación de colonias utilizando la sonda radiactiva del DNA de *EpapGV*.

Para ello, las colonias se repicaron por duplicado en medio selectivo LB-agar con kanamicina. Una de las réplicas obtenidas se usó para realizar el método de hibridación de colonias ó *colony-blot*. Las colonias desarrolladas en el agar se transfirieron a papel de filtro Whatman 541. Las colonias adheridas al papel se trataron por imbibición sucesiva dos veces durante 5 minutos en las siguientes soluciones: 0,5 M NaOH, 1 M Tris-HCl [pH 7,5] con agitación, 2 x SSC y, finalmente, en etanol.

Una vez seco, el filtro se sometió a la prehibridación, hibridación, lavados y exposición, tal como se ha descrito en el ítem I.9. Aquellas colonias que daban señal positiva de hibridación se seleccionaron por comparación con el control, para ser cultivadas en medio líquido y de esta manera obtener los plásmidos purificados que luego se analizarían por digestión con las respectivas endonucleasas de restricción.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

II. 1) Producción de EpapGV

Para disponer de insectos y virus fue necesario establecer una colonia de *Epinotia aporema*, que tal como se ha descrito en los M&M, la misma fue mantenida en el IMYZA, INTA Castelar. La Figura II.1, muestra uno de los recipientes de crecimiento de larvas (Sciocco-Cap *et al.*, 2001). En ellos se colocó la dieta artificial que además de alimentar a las larvas de *Epinotia aporema*, sirvió de vehículo del virus EpapGV. De esta manera se inició la amplificación viral (ver M&M).

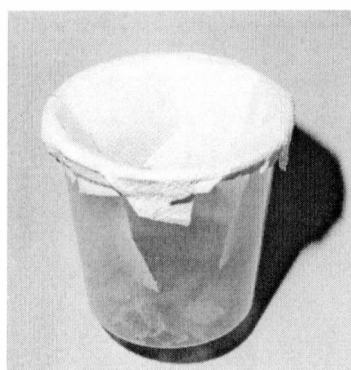


Figura II.1: Recipiente de crecimiento y mantenimiento de larvas de *Epinotia aporema*. Dentro del recipiente se pueden observar los trozos de dieta que se utilizan para alimentar las larvas. La producción de EpapGV se realiza en recipientes similares mediante la contaminación de la dieta con gránulos puros de EpapGV.

Una vez establecida la colonia *Epinotia aporema*, hubo que definir cuál iba a ser la mejor alternativa para reproducir y amplificar la cepa de EpapGV que originalmente había sido aislada de campo. En las situaciones óptimas, la obtención del DNA se realiza a partir de del clonaje de la variable silvestre por técnicas de purificación en placa, ésta técnica se ha aplicado para el estudio de gran número de genomas de NPVs. Para el caso de los GVs y algunos NPVs, la ausencia de líneas celulares estables susceptibles y capaces de soportar su replicación, potenció el desarrollo de las técnicas de clonaje *in vivo*. En 1985, Crook *et al.* purificaron totalmente un genotipo de un aislamiento de campo de CpGV, infectando larvas neonatas con dosis muy bajas de cuerpos de oclusión con el fin de lograr infecciones a partir de un único OB. Una modificación de este método en la que se utilizan diluciones de hemolinfa de larva infectada, hasta llegar a la mayor dilución que produce infección, fue publicada por Muñoz *et al.* en 1998.

EpapGV fue aislado de una única larva recogida en Oliveros, Santa Fé, Argentina. El virus obtenido de esta larva fue amplificado sucesivamente en una cría artificial de *E. aporema* que se mantuvo en el laboratorio de INTA Castelar. Los análisis moleculares que se han realizado sobre este virus a lo largo de los últimos años (ver más adelante) han

demostrado la homogeneidad de la cepa viral que se ha producido en el IMYZA-INTA-Castelar mediante la utilización de ésta técnica.

II. 2) Obtención del DNA

Para la obtención del DNA de *EpapGV* se siguieron los pasos del protocolo descrito en M&M. Esto garantizó la calidad del material obtenido. El DNA utilizado para la obtención de genotecas fue de alta pureza y concentración (Figura II.2).

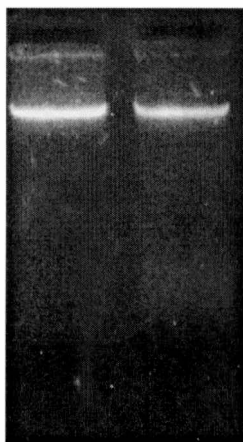


Figura II.2: DNA de *EpapGV*. Perfil electroforético en agarosa 0.8 % (teñido con BrEt) del DNA sin digerir de *EpapGV*. No se observan fragmentos ni agregados en la fosa. La integridad y calidad de extracción del DNA se determina por la ausencia de "chorreado" y agregados en la fosa.

Una vez obtenido el DNA, se determinó su integridad y concentración. Para determinar la integridad del DNA simplemente se hicieron las observaciones de la corrida electroforética del DNA en geles de agarosa 0.8% (Figura II.2), tal como se observa en la foto, el DNA no presenta agregados en la fosa ni distorsión o "chorreado" en la corrida. Para determinar la concentración y pureza se realizaron medidas espectrofotométricas a 260 nm y a 280 nm que permitieron una exacta cuantificación del DNA.

El DNA de *EpapGV* debido a su gran tamaño es un material muy frágil en solución, es muy susceptible de sufrir fragmentaciones por causas mecánicas, es por este motivo que el evento de resuspensión del DNA, en agua ó TE, debe ser realizado con precaución, caso contrario se obtendrá un DNA fragmentado (*nickeado*) que se observará en el gel como un "chorreado" continuo desde la fosa hasta el frente de corrida.

II. 3) Análisis del DNA con Enzimas de Restricción

La Figura II.3 muestra el DNA de *EpapGV* digerido con cada una de las enzimas que dieron origen a las cuatro genotecas: *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, y *Hind*III.

La digestión del DNA de *EpapGV* muestra productos de restricción de tamaño definido y con amplia variedad de longitud de fragmentos, esto fue lo que permitió pensar en la factibilidad de clonar el material genómico de *EpapGV*.

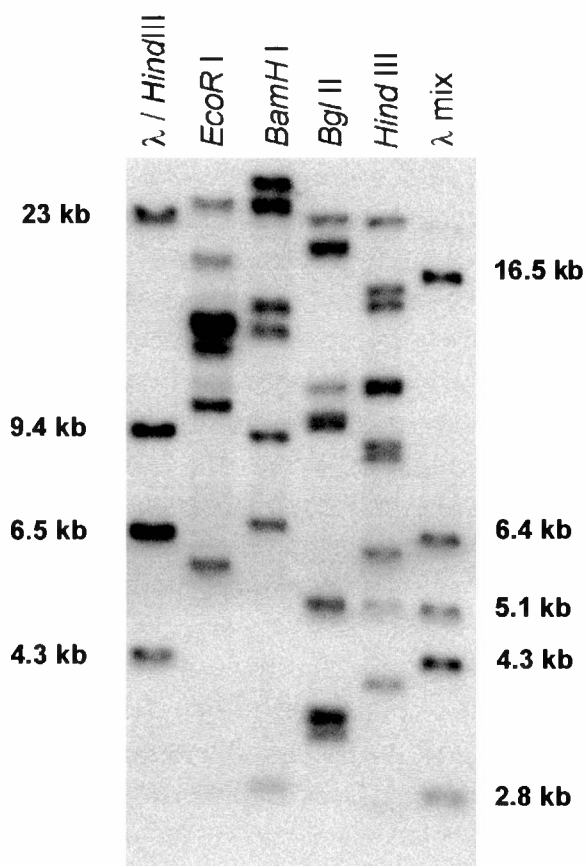


Figura II.3: Perfiles de restricción del DNA de EpapGV obtenidos por digestión con cada una de las enzimas que dieron origen a las bibliotecas genómicas. A la derecha e izquierda se muestran los marcadores de peso molecular utilizados. Esta foto corresponde a digestiones del DNA de EpapGV marcadas por fill-in usando $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$, resueltas por electroforesis en gel de agarosa 0.4 % y detectadas por autorradiografía (Parola *et al.*, 2002).

Asimismo, no se detectaron bandas submolares. Esto sugiere que se trata de una población viral genómicamente homogénea. En la tabla 1, se muestra la nomenclatura asignada a cada fragmento de restricción, los pesos moleculares correspondientes y los fragmentos que han sido clonados para cada una de las genotecas de EpapGV.

Fragmento ^a	<i>EcoRI</i> ^b	<i>BamHI</i> ^b	<i>HindIII</i> ^b	<i>BglII</i> ^b
A	27.6	43.5	23.7	23.5
B	18.7	25.6	19.8	16.6
C	14.6	15.6	19.6	15.6
D	14.4	14.2	11.4	11.5
E	14.3	9.5	10.1	11.2
F	13.4	6.8	9.8	9.4
G	10.5	3.0	5.3	8.7
H	5.9	1.3	5.1	6.3
I	0.3	0.298	3.7	5.2
J		0.084	3.7	4.2
K			3.5	2.7
L			2.1	2.6
M			1.3	2.0
N			0.9	0.75

Tabla 1: Fragmentos de Restricción de EpapGV. En esta tabla se describen todos los tamaños de fragmentos obtenidos por digestión del DNA de EpapGV con las diferentes enzimas de restricción, *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* y *BglII*. El fragmento de restricción de

mayor tamaño se observa en la genoteca de *BamHI* y corresponde a 43.5 kb, en tanto que el de menor tamaño corresponde al clon J de la misma genoteca y equivale a 0.08 kb. El fragmento de restricción de mayor tamaño que se ha clonado es el clon A de la genoteca *EcoRI* de *EpapGV* y el de menor tamaño clonado es el de 0.3 kb de la misma genoteca. **a** La nomenclatura de los fragmentos está dada por letras mayúsculas que se asignan en orden alfabético en orden decreciente de peso molecular. El tamaño de los fragmentos está en kilopares de bases (kb). **b** fragmentos que han sido clonados en cada genoteca están indicados en negrita.

II.4) Clonado de los fragmentos genómicos de *EpapGV*

Al inicio de la construcción de las genotecas con los fragmentos de restricción de *EpapGV* se intentó la utilización de los vectores *pBS-KS+* (Stratagene®, La Jolla, CA) y *pcDNAII* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los marcadores de selección de estos plásmidos corresponden al gen de ampicilina. Si bien estos plásmidos fueron eficientes en el clonado de fragmentos pequeños (máximo de 4.6 kb), no se obtuvieron resultados positivos para el clonado de fragmentos de mayor tamaño.

El proceso de construcción de la genotecas permitió observar las diferencias que presentan los diferentes vectores disponibles comercialmente, en cuanto a la eficiencia de clonado, particularmente en tamaños de insertos mayores a 4.5 kb.

Debido a que en los patrones de restricción de *EpapGV* contaban con una gran variedad de fragmentos de alto peso molecular, el plásmido *pZEROTM-2* fue el vector finalmente elegido para la construcción de las genotecas (Figura II.4).

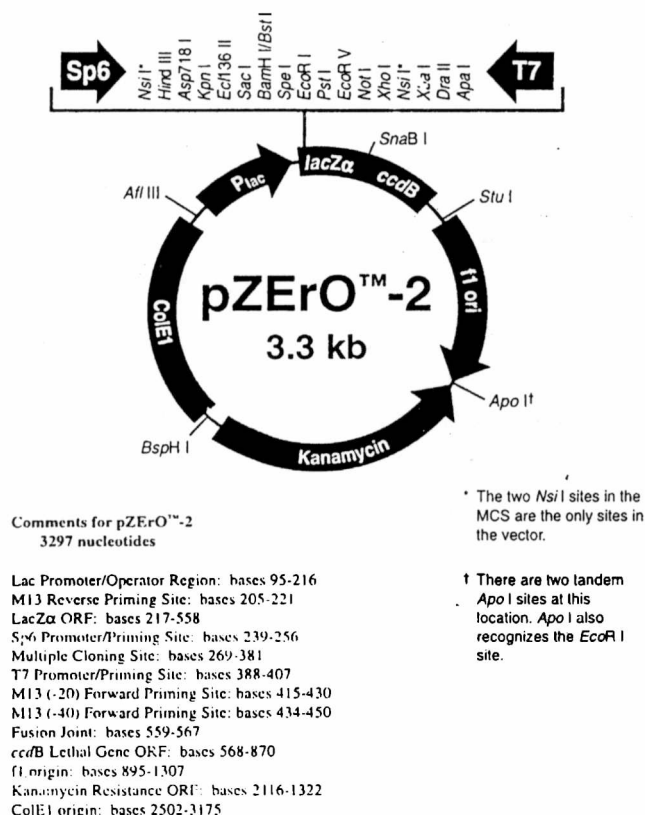


Figura II.4: Esquema y descripción del plásmido pZEROTM-2 (Invitrogen) que fue utilizado como vector de clonado para la construcción de las bibliotecas del DNA de *EpapGV*.

Tal vez la característica más notable en este vector, sea la presencia del gen *ccdB*, esto provoca una disminución notable de “falsas positivas”. El porcentaje de recuperación de recombinantes que se obtuvo con este plásmido fue muy alto, de casi un 95%. Otra de las ventajas de este sistema es la rapidez en los eventos de ligación, que consistían en 30 minutos para ligaciones cohesivas y 60 minutos para las *blunts*.

El fundamento del sistema pZerO, se basa en contener el gen letal de *E.coli*: *ccdB* (Bernard *et al.*, 1994). La proteína CcdB, interfiere en la acción de la topoisomerasa II bacteriana o DNA girasa. La DNA girasa es una enzima esencial, ATP dependiente, que cataliza el superenrollamiento negativo del DNA. Para esto, la girasa genera un *nick* que es resellado una vez que termina el proceso. De esta manera hay un momento en la reacción en que se genera un complejo intermedio girasa-DNA, llamado complejo *clivable*. La proteína CcdB, actúa *in vivo* e *in vitro*, (Bernard *et al.*, 1992, 1993) “envenenando” el complejo clivable por lo cual se inhibe el resellado del *nick* en el DNA doble cadena, lo que termina causando una activación del sistema de respuesta SOS y la muerte celular. El plásmido pZerO™-2, contiene el gen *ccdB* fusionado al extremo C-terminal de LacZ α . La inserción de un fragmento de DNA interrumpe la expresión de los genes fusionados *lacZ-ccdB*, permitiendo de esta manera que se seleccionen solamente recombinantes “positivos”. Las células que no contengan un vector recombinante serán “asesinadas”.

Para clonar los fragmentos de DNA de EpapGV generados por digestión con diferentes enzimas de restricción no se aislaron los fragmentos individuales con el fin de evitar manipulaciones innecesarias. Para los insertos de mayor tamaño, partir de las 5 kb en adelante las técnicas de elución del gel y luego ligación no dieron buenos resultados.

Debido a que la mayor parte de los fragmentos de restricción de EpapGV son de mayor tamaño (300 pb hasta las 45 kb), se procedió al clonado de los fragmentos en su conjunto y se observó que esta estrategia mejoraba sensiblemente la eficiencia de clonado de fragmentos de alto peso molecular.

II.5) Detección rápida de clones recombinantes

Al haber elegido la estrategia de ligación comentada en el paso anterior, se obtuvo como resultado un número muy grande de colonias, las cuales a su vez podían llegar a ser repeticiones de determinados clones, a todo esto hay que agregar que es sabido que los fragmentos más pequeños se clonan con mayor facilidad.

Debido a esta situación fue necesario analizar los clones obtenidos por un método rápido que permitiera clasificarlos de acuerdo al tamaño del DNA insertado. Con la técnica de Eckhardt permitió seleccionar los clones por rango de tamaños y de esta manera agrupar los que eran similares, disminuyendo el número de clones recombinantes a purificar (Figura II.5).

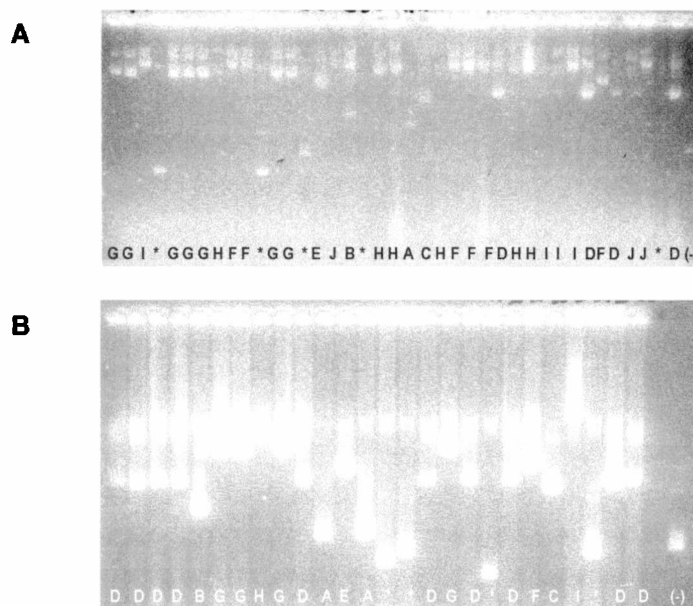


Figura II.5: Eckhardt de clones recombinantes de pZErO™-2/DNA de EpapGV. Tal como describe la técnica en M&M, las muestras se resuelven por electroforesis en gel de agarosa 1.0% y se visualizan por tinción con BrEt. Las letras representan a los diferentes clones seleccionados para purificar, indicando con **A** el clon más pequeño y así sucesivamente hasta el mayor, en tanto que **(-)** es el control negativo, pZErO™-2 sin inserto. Letras iguales significan grupos de clones considerados similares y * son los clones descartados por migrar más “lejos” que el control sin inserto. Las fotos **A** y **B** muestran los resultados de los ensayos Eckhardt realizados sobre clones de la genoteca *Bam*HI y sobre los clones de la genoteca *Eco*RI, respectivamente.

La técnica no tiene falsos positivos, si un plásmido migra “más lejos” que el control (plásmido sin inserto), el mismo debe ser descartado. Por este método fueron analizados aproximadamente 200 clones por genoteca. Con estos resultados, además de haber obtenido gran variedad de clones, se lograron separar clones que solo diferían entre si en 100 pb de diferencia, esto fue verificado luego cuando los clones seleccionados fueron purificados y analizados por restricción.

II. 6) Identidad de los DNAs insertados en las genotecas

Los clones seleccionados a partir del análisis de Eckhardt fueron purificados y luego analizados con enzimas de restricción. Para este análisis el DNA de los plásmidos fue purificado mediante el método de lisis alcalina (*minipreps*)

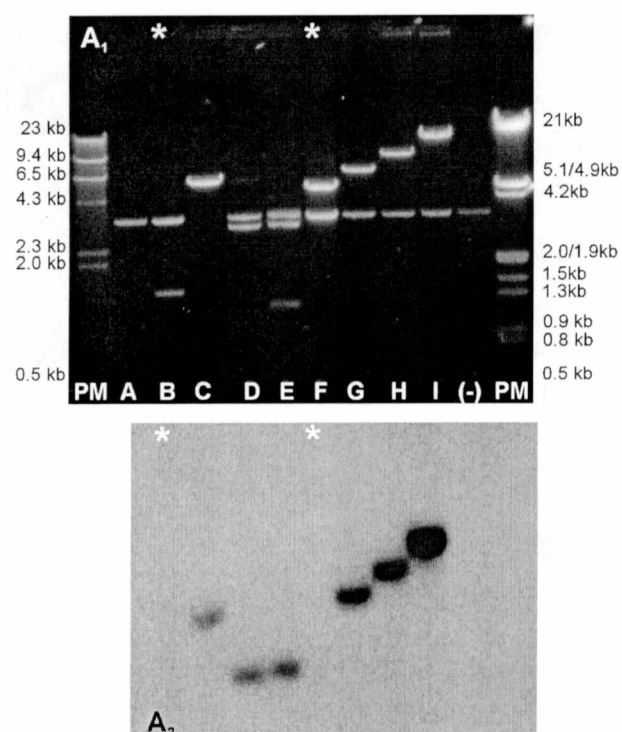


Figura II.6: A₁) Genoteca de EpapGV en *BamH* I. Muestra una fotografía de la genoteca incompleta *BamH*-I de EpapGV en pZErOTM-2. MW: patrón de peso molecular, λ /Hind III a la izquierda y λ /Hind III-EcoRI a la derecha de la foto. Las letras indican el nombre de cada clon y pZErO es el plásmido control sin inserto. Las muestras se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa 0.8% y se visualizaron por tinción con BrEt bajo luz UV. **A₂)** Muestra una autorradiografía de la misma genoteca. La sonda utilizada fué DNA de EpapGV digerido y marcado radiactivamente con [³²P]dATP. Como control negativo se usó el plásmido pZErOTM-2. Detalles sobre nomenclatura de cada clon y su RM se pueden observar en la Tabla 1.

Las *minipreps* se digirieron con las enzimas indicadas en la Tabla 1 (ver M&M). De esta manera fueron analizados aproximadamente 100 clones por genoteca. En la Figura II.6.A₁ y Figura II.7.B1 se pueden observar resultados de las genotecas obtenidas para DNA de EpapGV digerido con *BamH* I y *Bgl* II respectivamente.

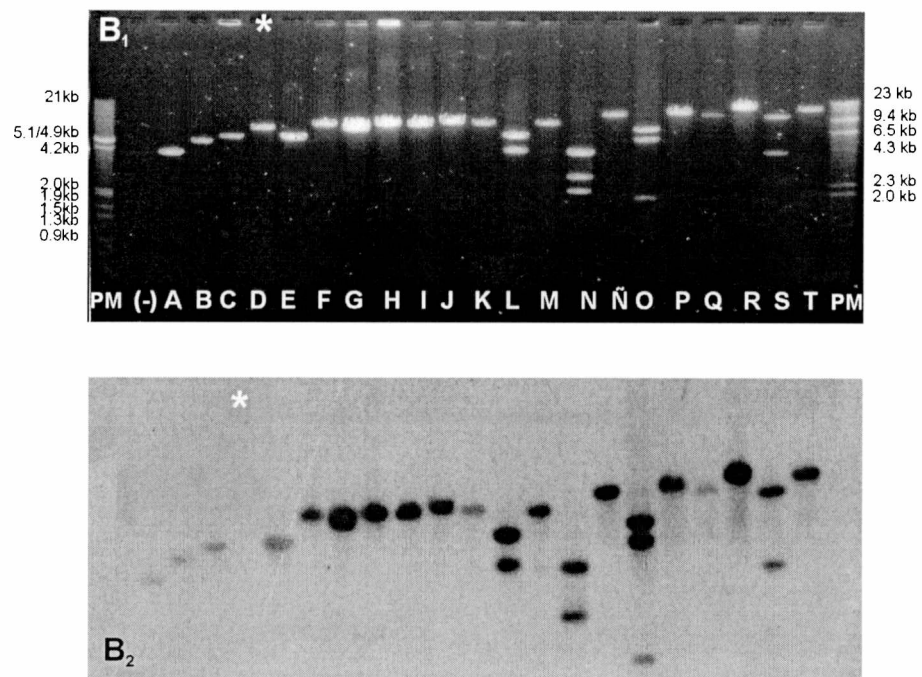


Figura II.7: Genoteca de EpapGV en *Bgl* II, B1) Muestra una fotografía de la genoteca completa *Bgl* II de *EpapGV* en pZErO™-2. MW: patrón de peso molecular, λ Hind III-*EcoRI* a la izquierda y λ Hind III a la derecha de la foto. Las letras indican el nombre de cada clon y pZErO es el plásmido control sin inserto. Las muestras se desarrollaron por electroforesis en gel de agarosa 0.8% y se visualizaron por tinción con BrEt bajo luz UV. **B2)** Muestra una autorradiografía de la misma genoteca. La sonda utilizada fue DNA de *EpapGV* digerido y marcado radiactivamente con [32 P]dATP. Como control negativo se usó el plásmido pZErO™-2. Detalles sobre nomenclatura de cada clon y su PM se pueden observar en la Tabla 1.

La genoteca completa de *EpapGV* en *EcoR* I que se ilustra en la Figura II.7.C1, comprende a ocho fragmentos clonados, siendo el clon de 28 kb el de mayor tamaño clonado y 5.8 kb el de menor tamaño. La genoteca de *EpapGV* en *EcoR* I tiene como fragmento más pequeño uno de 310 pb, que fué clonado junto a uno de los de 14.8 Kb, por ese motivo en la Figura II.7A no se muestra como un clon obtenido individualmente.

Los clones caracterizados por el tamaño de sus insertos fueron también analizados para confirmar la identidad viral de los fragmentos clonados. Para ello, se realizaron análisis de *Southern blot* utilizando como sonda el DNA de *EpapGV* marcado radiactivamente con 32 P (Figuras II.6A1; II.7B1 y II.8C1). Asimismo y en algunas ocasiones, esta identificación se realizó por hibridación de colonias (*colony-blot*) previo al análisis por tamaños.

Estos análisis permitieron seleccionar y clasificar la colección de clones e incluirlos definitivamente como integrantes de las genotecas de *EpapGV*. En la Fig.II.6.A2 se muestra el resultado de uno de tales experimentos, correspondiente a la genoteca de *Bam*HI. Dada la falta de señal de hibridación positiva con el DNA de *EpapGV*, los clones B y F fueron eliminados de esta genoteca.

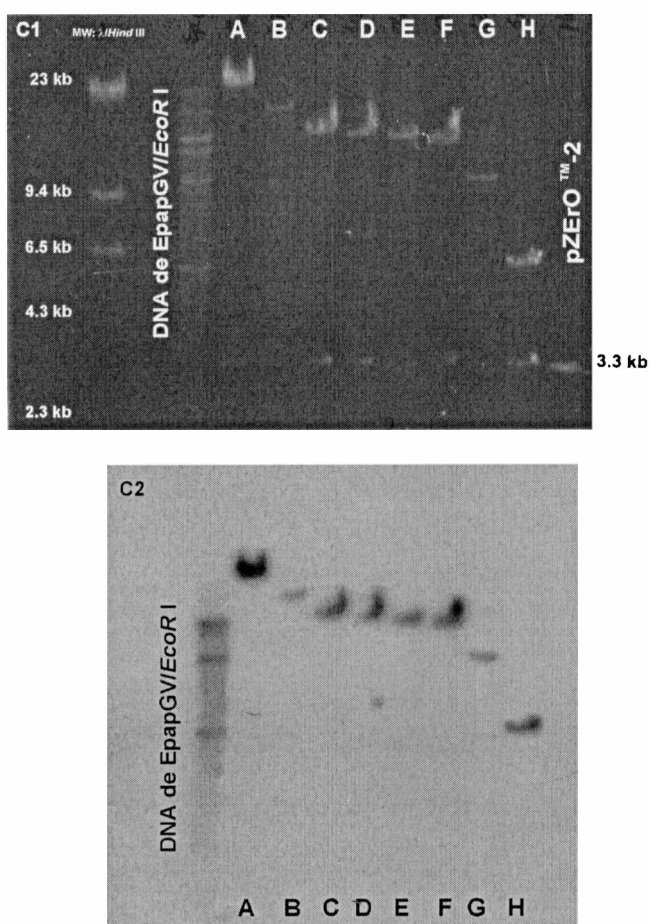


Figura II.8: Genoteca de EpapGV en *EcoR* I, La figura muestra una fotografía de la genoteca completa *EcoR* I de *EpapGV* en pZErO™-2 y su respectivo Southern. MW: patrón de peso molecular, λ /Hind III. La siguiente calle muestra el DNA de *EpapGV* digerido con *EcoR* I, como control positivo. Las letras indican el nombre de cada clon y pZErO es el plásmido control sin inserto, utilizado como control negativo del Southern. Las muestras se desarrollaron por electroforesis en gel de agarosa 0.8% y se visualizaron por tinción con BrEt bajo luz UV y luego se transfirieron a membrana. El detalle de la nomenclatura y PM de cada clon obtenido se puede observar en la Tabla 1.

La misma situación se observó en otras genotecas, se encontró un clon negativo a la sonda de *EpapGV* en la genoteca de *Bgl* II (Figura II.7.B2) y 2 clones negativos para la de *Hind* III.

La genoteca completa de *EpapGV* en *EcoR* I dió 100% de hibridación positiva tal como se puede observar en la Figura II.8.C2. En todos los casos se usaron los controles respectivos, control positivo de hibridación una alícuota de DNA de *EpapGV* y como control negativo al vector sin inserto pZErO™-2. Ambos controles dieron los resultados esperados. No se detectó hibridación con el vector y si se observó hibridación con el DNA de *EpapGV*.

En resumen, el conjunto de fragmentos *EcoR* I clonados corresponde al 100% de la secuencia genómica de *EpapGV*. Asimismo se ha clonado el 80% de la secuencia de *EpapGV* en fragmentos *Bgl* II, un 60% de los de *BamH* I y un 45 % de los de *Hind* III.

Los resultados que se han obtenido y presentado en este capítulo, han permitido continuar los estudios genómicos sobre el virus EpapGV y han aportado una importante fuente de información fácilmente accesible, que ha sido utilizada por otros miembros del laboratorio en sus respectivos trabajos de tesis.

En este sentido la construcción de las genotecas permitieron:

Iniciar la búsqueda del gen *egt*, ver Cap III. (Manzán *et al.*, 1999).

Confirmar la posición del gen de *granulina*, ver Cap III.

Finalizar la construcción del mapa físico del virus. (Parola *et al.*, 2002).

Secuenciar los extremos de los fragmentos clonados, ver Cap IV. (Manzán *et al.*, 1999).

Determinar la ubicación de más de 31 ORFs en el mapa de EpapGV (Parola *et al.*, 2002).

Generar plásmidos con genes de *granulina* y *egt*, en sentido *sense* y *anti-sense* para realizar el seguimiento de la infección por ensayos de hibridación *in situ*. (Goldberg *et al.*, 2000).

Estudiar otros genes de interés, tales como:

- *Helicasas* (importantes en rango de huésped). Manzán *et al.*, 2002
- *f-95* (posible proteína fusogénica homóloga a Ld130). Goldberg *et al.*, 2002.
- DNA *pol*, genes *ie* y estudios de sus promotores. Mendez *et al.*, 2002.

CAPÍTULO III

Estudio Biológico molecular del gen *egt*

Capítulo III: Estudio biológico molecular del gen *egt*.

Entre las características patológicas de ciertos baculovirus, se destaca su habilidad en retrasar o suprimir el desarrollo normal de los insectos infectados. Esto constituye una estrategia de supervivencia del virus ya que al afectar el metabolismo del huésped y prolongar su etapa larval, el virus dispone de más tiempo para llevar a cabo mayor número de eventos de replicación y producción de progenie.

Para identificar los factores virales que están involucrados en la patología de la larva, resulta esencial entender el ciclo de desarrollo del insecto y los efectos de la infección sobre el mismo.

Uno de los genes responsables de este comportamiento es el gen *egt* y su producto, la enzima ecdisona glicosil transferasa (EGT).

Para una mejor comprensión de los factores involucrados, comenzaré por una breve descripción del ciclo de desarrollo y la fisiología general de la ecdisis en los insectos. Luego, mencionaré el rol del gen *egt* en los baculovirus y su efecto sobre la fisiología del insecto infectado.

Por último, describiré el trabajo realizado en esta parte de la tesis, que incluye la ubicación, aislamiento, clonado, secuenciamiento, análisis y expresión del gen *egt* de EpapGV.

INTRODUCCION

Ciclo de desarrollo en insectos

El desarrollo post-embionario de los insectos se divide en una serie de estados, cada uno separado del siguiente por una muda. La forma que presenta el insecto entre mudas, desde su eclosión hasta alcanzar el estado adulto, se denomina estadio. Según los cambios morfológicos que ocurren durante su ciclo de desarrollo, los insectos pueden ser agrupados en tres categorías: ametábolos, holometábolos o hemimetábolos.

Los insectos **ametábolos** no presentan metamorfosis, y así, la forma adulta resulta de un incremento progresivo de tamaño acompañado por madurez sexual y ambos estados (larval-adulto) comparten siempre el mismo habitat. En los insectos **hemimetábolos**, la larva -también llamada ninfa- presenta una forma similar al adulto, pero no posee alas ni genitales. En este grupo sobre todo en los casos en que el estado larval y el adulto no comparten el mismo habitat las larvas muestran ciertas características morfológicas adaptativas, que pierden al llegar al estado adulto. Entre los ejemplos más comunes de este tipo de metamorfosis incompleta, se pueden citar los insectos de los órdenes

Orthoptera (tucuras, langostas) y *Hemiptera* (como las chinches), siendo los odonatos acuáticos un ejemplo característico de aquellos que sufren, además, cambios relacionados con su adaptación al medio.

Finalmente, en los insectos **holometábolos**, las larvas son generalmente muy diferentes a los adultos, apareciendo un estado pupal intermedio previo al estado adulto. Poseen, entonces, lo que se denomina metamorfosis completa y son característicos de este grupo las clases *Neuroptera*, *Trichoptera*, *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera* y *Siphonaptera*.

Las etapas de desarrollo de lepidópteros, se esquematiza en la Figura III.1.

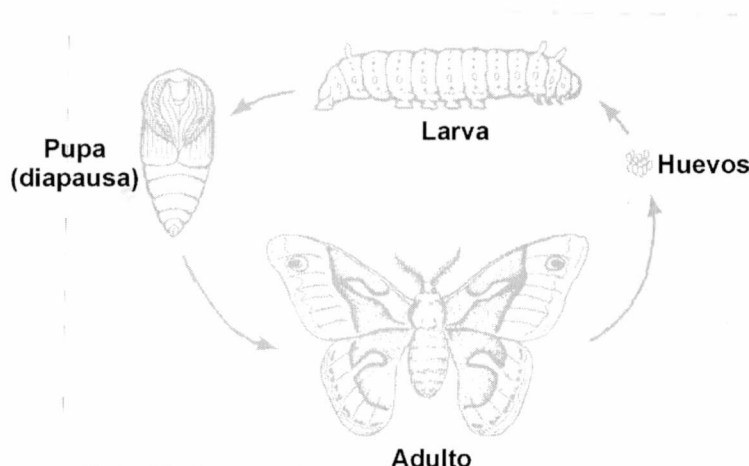


Figura III. 1: Ciclo de desarrollo de un insecto holometábolo. El ciclo se inicia con la transformación de los huevos en larva para luego continuar con la pupación de las mismas que los llevará al estado adulto.

El insecto en estado larvario está especializado en alimentarse y crecer, por lo tanto este estado es el que causa mayores daños a los cultivos. La pupa es un estado dormido exteriormente, en el que ocurre una extensa reorganización interna, que origina la forma adulta y no tiene ningún parecido morfológico con la pupa o los estadios previos. El estado adulto es el reproductor y en algunas especies no está preparado para comer. En particular, los lepidópteros se alimentan a través de su espiritrompa, de néctar y agua.

Todos los eventos que ocurren en el ciclo de vida están bajo el control principal del sistema endocrino y del sistema nervioso del insecto.

Sistema Endocrino del Insecto

Las hormonas circulan por la sangre (en insectos: hemolinfa) con el fin de regular a mediano y largo plazo y a distancia, las actividades fisiológicas, de desarrollo y comportamiento de un organismo. En los insectos el sistema hormonal se complementa con el sistema nervioso, que provee coordinación a corto plazo.

El control endócrino del desarrollo y muda de los insectos (Figura III. 2) depende de varias hormonas principales:

Las células neurosecretorias ubicadas en el cerebro, producen la **hormona protorácicotrópica (PTTH)**. Esta es una pequeña proteína de aproximadamente 5000 Da, que es liberada a la hemolinfa previo paso por el *corpus cardiacum* y el *corpus allatum*.

La PTTH liberada a hemolinfa activa la liberación de la **ecdisona (Ec)** por parte de la glándula protorácica. La **ecdisona**, también llamada hormona de la muda es un esteroide muy parecido al colesterol, del que difiere principalmente por poseer mayor número de grupos hidroxilos que aumentan su solubilidad en agua. Se presume que en lepidópteros, la liberación de esta hormona vía *corpus allatum*, se debe a una señal neural inducida cuando el insecto alcanza cierto tamaño.

Otras células neurosecretorias producen la **hormona de eclosión (EH)** y la **bursicona**. EH influye en el proceso de eclosión, plastización de la cutícula de las alas y estímulo de la liberación de bursicona. Esta última interviene en el proceso de endurecimiento-oscurecimiento de la capa quitinosa externa, que se completa varias horas después de la muda.

Los *corpora allata*, que contienen tejido endócrino no nervioso, secretan la **hormona juvenil (JH)**. Esta hormona, junto a la ecdisona, favorece la retención de características “juveniles” de la larva, aplazando la metamorfosis hasta que se haya completado el desarrollo de la misma.

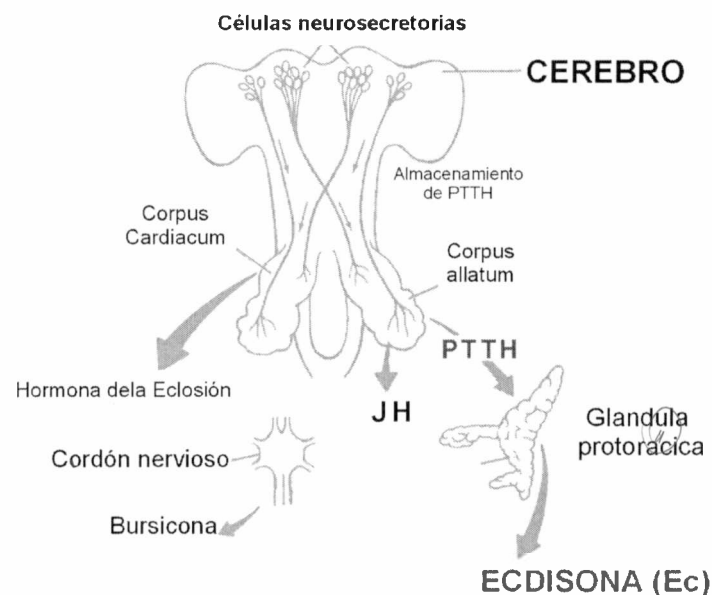


Figura III. 2: Esquema del sistema nervioso en insectos: se describen las hormonas producidas por el SNC que luego van a tener influencia sobre el proceso de la muda del insecto. Hormona protorácica (PTTH); Hormona juvenil (JH); Ecdisona (Ec) y Bursicona.

Hormonas de la muda

Se denominan “hormonas de la muda” a los ecdisteroides producidos en la glándula protorácica. En el proceso de desencadenamiento de la muda están involucrados la PTTH y la hormona juvenil. Como se mencionara, en la mayoría de los insectos, las glándulas protorácicas producen y secretan ecdisona, pero se sabe que en algunos lepidópteros la secreción es de 3-dehidroecdisona. En la hemolinfa la 3-dehidroecdisona es convertida a ecdisona por acción enzimática (Fescemeyer *et al.*, 1995).

La ecdisona es una pro-hormona que es convertida a hormona activa (20-hidroecdisona) en el cuerpo graso o en la epidermis, por acción enzimática del citocromo P450. Existe una excepción que se da en abejas *Apis mellifera*, en la cual el principal ecdisteroide es la makisterona A. En la Figura III.3 se detalla la estructura de los ecdisteroides y de la JH.

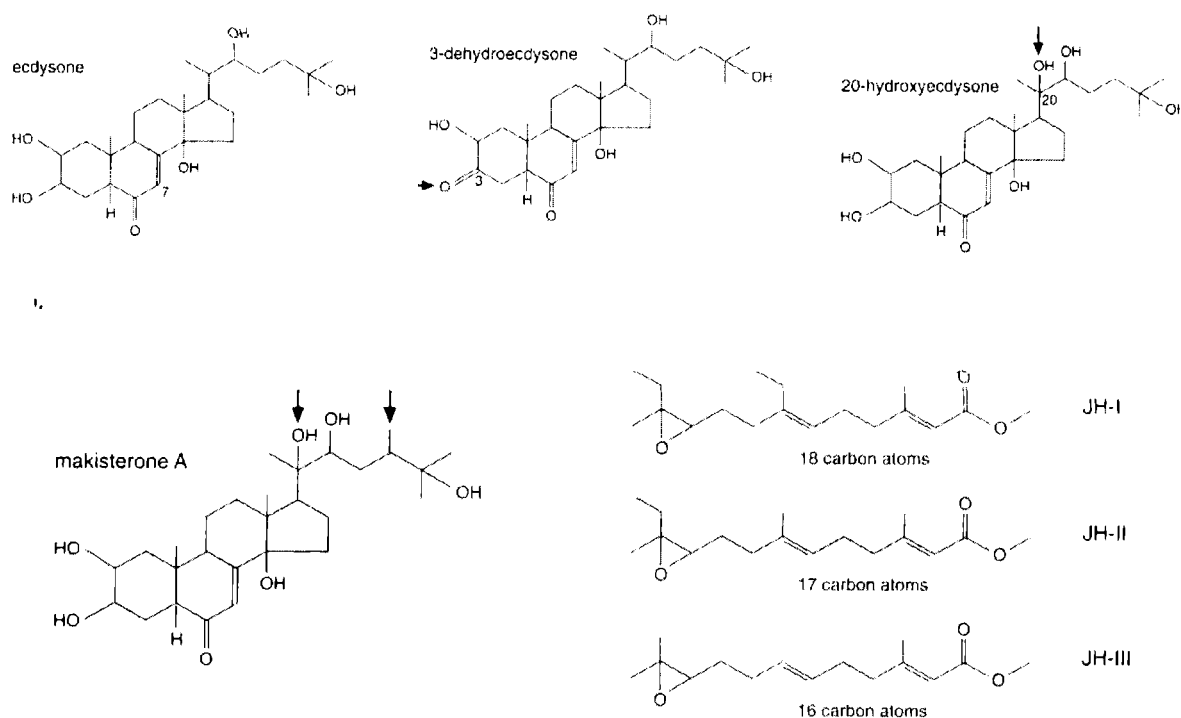


Figura III. 3: Hormonas de la muda, estructura de los diferentes ecdisteroides y hormona juvenil producidos por insectos. Las flechas indican los grupos químicos que diferencian a cada una de ellas con la ecdisona.

Producción hormonal

Según el estado de desarrollo, la producción de la hormona se puede dar en órganos diferentes. En los estados inmaduros de todos los insectos, los ecdisteroides son producidos por las glándulas protorácicas. Pero en los adultos hembras, en las que estas hormonas son producidas para regular el desarrollo embrionario, las células del folículo ovárico son el principal origen de las mismas. También hay evidencia de que, en

determinados insectos, algunos ecdisteroides son producidos probablemente por los *oenocitos* del abdomen.

Las glándulas protorácicas se encuentran difusamente distribuidas detrás de la cabeza y muestran ciclos de desarrollo asociados con la secreción, tendiendo a degenerar en los adultos de la mayor parte de los insectos. La persistencia normal de las glándulas a través del desarrollo es consecuencia de la presencia de la hormona juvenil.

Los insectos no pueden sintetizar esteroides; por lo tanto, el colesterol o compuestos relacionados que se utilizan para la síntesis de las hormonas son componentes esenciales de la dieta del insecto.

Los Ecdisteroides son transportados en la hemolinfa unidos a proteínas. Los títulos de hormonas en hemolinfa varían según patrones temporales específicos necesarios para la propia regulación de las actividades que ellas modifican. Estas variaciones en su título son producidas por cambios en su síntesis, liberación, degradación, modificación y excreción.

La ecdisona no se almacena en la glándula protorácica. Su aparición en hemolinfa es un reflejo directo de su inmediata síntesis en la glándula. Normalmente, su síntesis está bajo un doble control. La liberación es inducida por acción de la hormona protorácica, PTTH, pero sus efectos son modulados, al menos en algunos insectos, por acción de una hormona inhibitoria y por regulación neural directa, que puede ser tanto estimulatoria como inhibitoria. La respuesta de la glándula a la acción de la PTTH varía a través del ciclo de desarrollo de la larva (Fescemeyer *et al.*, 1995). A su vez también los niveles de ecdisteroides y de la hormona juvenil en hemolinfa afectan la producción de ecdisona pero de manera diferente. Durante el período de alimentación de la larva, la hormona juvenil inhibe la síntesis de ecdisona (la JH no ejerce efecto por sí misma, el efecto de la JH en insectos inmaduros es solo modificar la respuesta a los ecdisteroides). Aún así, los ecdisteroides producidos por las glándulas protorácicas ejercen retroalimentación (*feedback*) positiva que se ve favorecida por la presencia de la JH. Cuando la glándula es altamente activa, los ecdisteroides ejercen un *feedback* negativo que contribuye a un rápido descenso de la concentración de ecdisona (Sakurai y Williams, 1989).

La proporción en que la ecdisona se transforma en hormona activa o 20-hidroxiecdisona también varía. Su concentración en hemolinfa resulta del balance de procesos de secreción y degradación así como también por su conversión a conjugados, que la transforman en inactiva. Como resultado de esto, el período en que la hormona se encuentra activa en circulación es muy limitado. Por ejemplo para el tercer estadio de *Calliphora* se ha determinado una vida media de tres horas mientras que para la pupa la vida media se extiende por más de un día.

Los ecdisteroides y la hormona juvenil, son hormonas lipofílicas, por lo cual su pasaje a través de la membrana es muy rápido. Se unen a un receptor proteico intracelular

específico, regulando la expresión de genes a nivel transcripcional. La hormona PTTH es uno de los ejemplos de hormonas que se une a un receptor específico de membrana y genera segundos mensajeros (cAMP o cGMP) que activan o inactivan enzimas específicas vía una proteína kinasa. A su vez, la PTTH no solo inicia la formación de ecdisona en la glándula protorácica, sino que también promueve la producción de β -tubulina, la cual puede ser muy importante para el transporte de los precursores ecdisteroides dentro de las células (Rybczynski y Gilbert, 1995).

Rol de los ecdisteroides

En la epidermis, la ecdisona inicia la síntesis de novo de DOPA decarboxilasa y también activa las enzimas que intervienen en el proceso de conversión de la fenol oxidasa a partir de su proenzima, de esta manera se dispone de las enzimas esenciales para el oscurecimiento o teñido cuticular. Las hormonas ecdisteroides también regulan otras actividades, principalmente relacionadas a la actividad del sistema nervioso.

Su acción depende de la presencia de sus receptores en el tejido blanco. Existen al menos tres isoformas de receptores cuya presencia varía temporalmente. Pueden estar en la mayoría de los tejidos con lo cual las hormonas cumplirán una función general o pueden estar en células o tejidos específicos con lo cual la función regulatoria será específica.

En síntesis, la ecdisona actúa sobre los tejidos blanco (epidermis, cuerpo graso y discos pupales) a través de la activación transcripcional de ciertos genes principalmente estimulando la secreción de una nueva cutícula.

Muda y metamorfosis

Los factores responsables del inicio de la muda aún no se comprenden completamente, si bien se sabe que el crecimiento cuticular y los cambios de forma ocurren cuando el insecto se prepara para realizar la muda. Como ya se mencionó, estos procesos en un principio están gobernados por dos clases de hormonas: la hormona juvenil y las hormonas de la muda (ecdisteroides). La muda es inducida y regulada por los ecdisteroides. Cuando su concentración aumenta en la hemolinfa, las células de la epidermis muestran un patrón complejo de síntesis de DNA y RNA. El tipo de cutícula producida depende de la presencia ó ausencia de la hormona juvenil en los períodos críticos del desarrollo de cada estado, que es previo a cada cambio larva-larva, larva-pupa, pupa-adulto (Fig. III.4). Este período crítico usualmente ocurre cuando los ecdisteroides se preparan para iniciar la próxima muda. Por lo tanto, el programa de expresión de genes que se inicia es diferente si está o no presente la hormona juvenil.

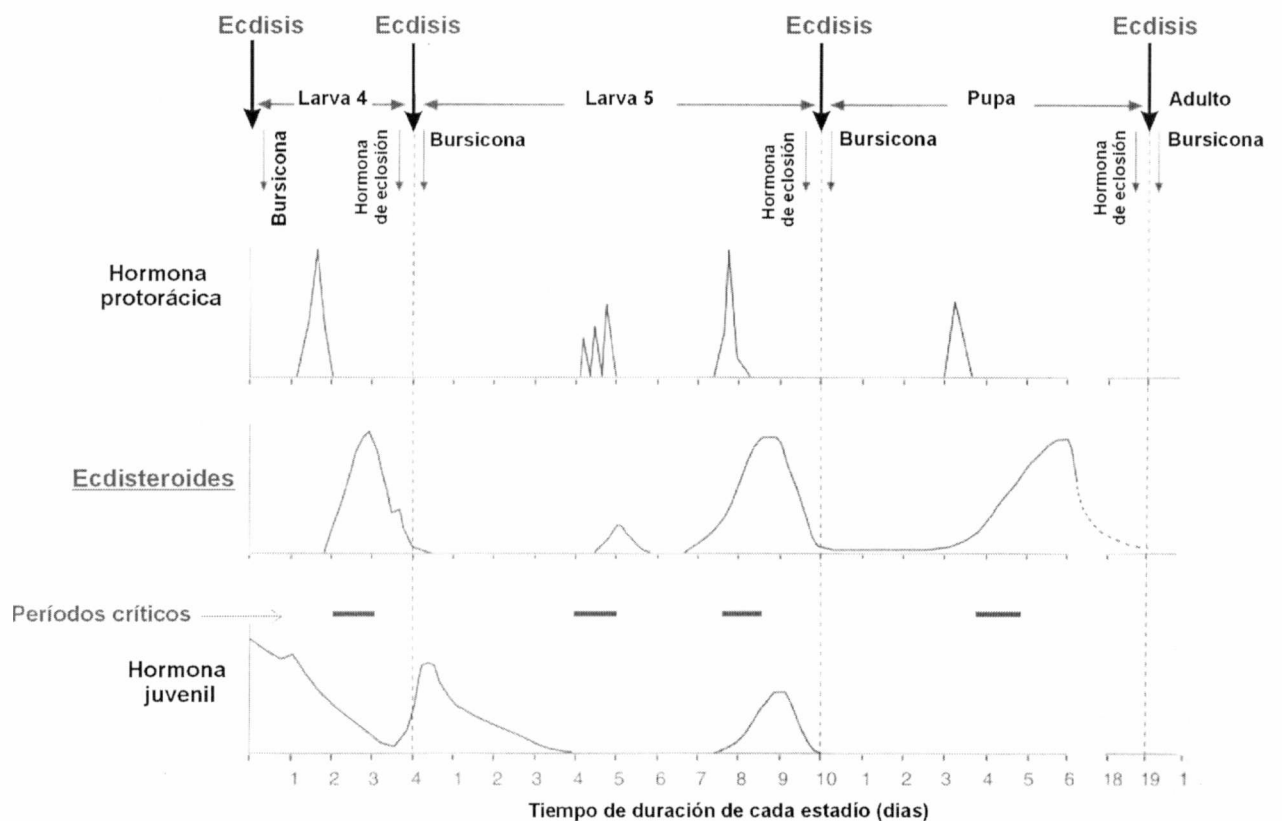


Figura III. 4: Esquema de los cambios en los títulos de las hormonas que regulan la muda en insectos holometábolos. Para la muda de larva a larva, la hormona juvenil está presente durante los periodos críticos; pero no está presente en el primer periodo crítico del proceso de muda de larva a pupa. El segundo periodo crítico de ésta misma etapa si es sensible a la hormona juvenil. Las hormonas de eclosión y la bursicona son producidas durante breves periodos de tiempo antes y después de cada ecdisis. La hormona protorácica y los ecdisteroides presentan picos de liberación simultánea durante los periodos críticos para los eventos de muda entre larva y pupa. Asimismo, para la muda larva -larva y pupa – adulto, se observa la misma aparición durante los periodos críticos pero ligeramente desfasadas, anticipándose la liberación de la hormona protorácica a la liberación de los ecdisteroides [Grafico basado sobre datos de muda en el Lepidóptero *Manduca*, modificado de Chapman, 4ª Ed. "The insects"]

Los principales cambios que se producen durante la muda están afectados por estas dos hormonas aunque también existen otros múltiples factores que intervienen en su regulación, la secuencia de eventos son: inicio de la muda, cambios en la producción de ecdisteroides, control de los procesos de ecdisis y control de la esclerotización.

En general, es cierto que los insectos mudan en respuesta a la necesidad de tener que alcanzar cierto tamaño, aunque también se sabe claramente que intervienen otros factores además del tamaño. En lepidópteros como *Manduca*, los insectos inician su proceso de muda cuando alcanzan un determinado peso corporal y el tamaño al cual ocurre la muda no es un valor absoluto sino que depende del tamaño del insecto al inicio del estadio. Sin embargo, algunas especies mudan al estar hambrientas y ellas se vuelven más pequeñas. Tal es el caso de ciertas orugas y gorgojos que viven en productos almacenados en los que claramente se denota que existe algún otro factor involucrado en la muda distinto del

incremento de tamaño. En líneas generales, la metamorfosis ocurre cuando los ecdisteroides son producidos en ausencia de la hormona juvenil (Fig. III. 4 y 5).

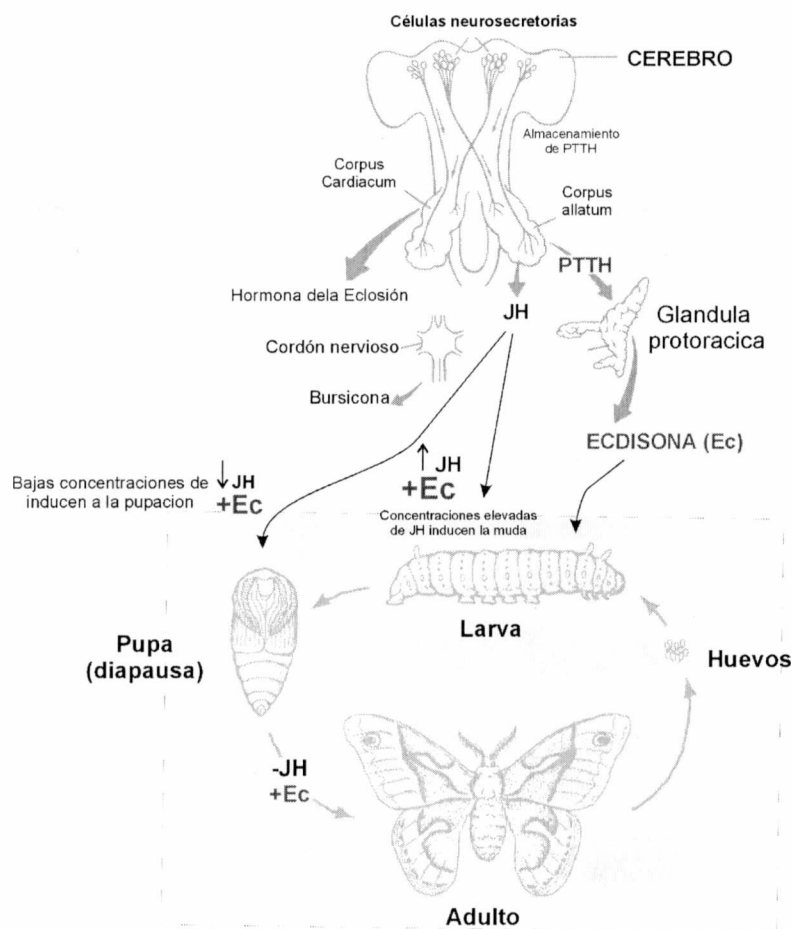


Figura III. 5: Esquema integrado del control ejercido por el SNC y el sistema hormonal sobre los procesos de desarrollo de los insectos holometábolos.

En *Manduca*, el cambio hacia la metamorfosis está relacionado con el tamaño de la cabeza al inicio del estadio larval. Si en ese momento, el ancho de la cabeza es menor que 5 mm, la producción de la hormona juvenil continúa con lo cual la larva está obligada a mudar a otro estadio larval. Si el ancho de cabeza excede los 5 mm entonces la larva se convierte en pupa. No se conoce el mecanismo por el cual el insecto “detecta” su cambio de tamaño ni tampoco cómo se transmite esta información en el cuerpo, sólo se conoce que existe algún aspecto relacionado al tamaño de la cabeza que es relevante para iniciar el proceso de muda. Asimismo la producción de hormona juvenil se detiene cuando la larva alcanza un peso de 5 gramos, peso en el cual se ve obligada a empupar.

Ecdisteroides como molécula blanco de una proteína baculoviral

Estudios realizados por Park *et al.*, en 1996 sobre larvas de *Lymantria dispar* infectadas con LdMNPV demostraron lo que previamente se había postulado, la infección viral interfiere

en el desarrollo del insecto por alteración del balance hormonal del huésped aumentando la concentración de las hormonas ecdisteroides.

Los últimos estadios de *L. dispar*, mostraron un patrón consistente de alto nivel de ecdisteroides después de la infección viral. Se observó que cuando la enzima *EGT* se encuentra presente en la hemolinfa, la mayor parte de las hormonas de la muda se encuentran glicosiladas. Este conjugado es una forma inactiva de la hormona (Figura III. 6), llevando a los insectos a la imposibilidad de mudar a pesar de los altos niveles de ecdisteroides en hemolinfa.

También se encontró que el nivel de producción de ecdisteroides por parte de la glándula protorácica es mayor en los insectos infectados que en los controles y que el nivel de ecdisteroides en hemolinfa es reflejo directo de la actividad glandular.

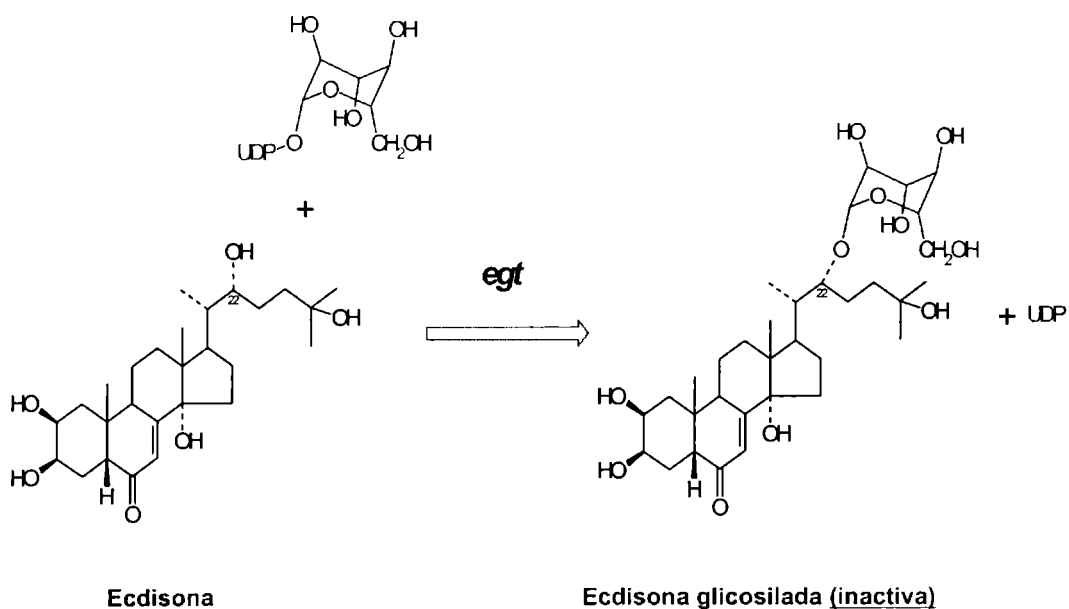


Figura III. 6: Esquema de glicosilación de la Ecdisona. El proceso de glicosilación genera un complejo glicosilado (Ecdisona + UDP-Glicosa) que inactiva a la hormona, de esta manera se inhibe el proceso de muda en el insecto.

Aunque se había informado que la inhibición de la muda se podría deber al efecto de la replicación viral en las células glandulares (Volkman y Keddle, 1990) e incluso en la glándula protorácica (Dougherty *et al.*, 1987), en el estudio realizado sobre larvas de *L. dispar* se demostró que si bien hay replicación intensa en tejidos como traqueolas y cuerpo

graso, la inhibición de la muda se debe a la acción de la enzima EGT y no a la inhibición por infección viral de la glándula.

Los baculovirus podrían modificar de diferente manera el nivel de ecdisteroides del huésped. Una posibilidad es que se produzca una alteración de la regulación *feedback* de la síntesis de los ecdisteroides a medida que se produce la expresión del gen *egt* y la conjugación de los ecdisteroides producidas por EGT. También es posible que esta regulación se vea alterada por el cerebro y otros tejidos involucrados. Entre otras cosas, queda aún por determinar cuál es el mecanismo involucrado en la activación de las glándulas protorácicas en insectos infectados.

Gen *egt*, su proteína y su actividad enzimática

El gen *egt* fue identificado en una región del genoma de AcMNPV que no es esencial para la replicación viral (O'Reilly y Miller, 1989), es transcripto tempranamente en el periodo de infección y va declinando hacia el final de la infección. Se han detectado dos transcritos tempranos mRNAs, de 1.8 y 3.0 kb ubicados 43 nucleótidos *upstream* del sitio de iniciación transcripcional y que dan lugar a una proenzima de 506 aa (O'Reilly y Miller, 1990). La proteína EGT, es secretada de la célula infectada y tiene un peso molecular aparente bajo condiciones desnaturalizantes de 60 kDa. El análisis de la secuencia N-terminal de EGT muestra una secuencia señal de 18 aminoácidos mayoritariamente hidrofóbicos, que es escindida de la proteína inmadura durante la exportación de la misma. Posee además 7 sitios potenciales de N-glicosilación pero no está claro aún cuales son los que efectivamente están glicosilados.

Por acción de la enzima EGT se genera un glicósido de ecdisona (y también con sus derivados), debido a la conjugación de la ecdisona y un UDP-azúcar, que puede ser UDP-glucosa o UDP-galactosa, según qué monosacárido está disponible en la hemolinfa. La estructura del glicósido ecdisona-glucosa, ha sido determinada por CGL, espectrometría de masa y resonancia magnética nuclear (O'Reilly *et al.*, 1991). Esto mostró que la glucosa se une al hidroxilo de la posición del C-22 de la molécula de ecdisona, formando el conjugado 22-O-β-D-glucopiranosido y que este C-22 es absolutamente esencial para que ocurra el evento de conjugación. La conjugación del ecdisteroide 20-hidroxiecdisona es de particular importancia porque *in vivo* es la forma activa de la hormona.

En los análisis de alineamientos de secuencia de todas las EGTs conocidas (incluyendo las derivadas de mamíferos) se identificaron 5 dominios de alta conservación. Incluso estos dominios se encuentran conservados en secuencias de bacterias, plantas y nemátodos. En los dominios III y IV, se destacan 7 residuos de aminoácidos conservados en todas las glicosiltransferasas lo que sugiere que ellos desempeñan un papel esencial en la actividad enzimática. (O'Reilly DR. 1995)

Efectos de EGT sobre los insectos infectados

El efecto de la expresión del gen *egt* sobre el desarrollo de insectos infectados fue evaluado por generación de recombinantes derivados de AcMNPV a los cuales se le había inactivado el gen *egt* (O'Reilly y Miller, 1989). Los ensayos demostraron que la conjugación de los ecdisteroides con los azúcares era suficiente para bloquear su actividad.

Los datos sugieren que, en efecto, la función del gen *egt* es aumentar el tiempo de alimentación del insecto infectado. Por inhibición de la muda el insecto continuaría alimentándose lo que aumentaría la sobrevivencia viral. Normalmente, insectos no infectados dejarían de alimentarse durante el período que precede a cada evento de muda.

Los análisis de las propiedades de los mutantes AcMNPV (*egt*-) revelaron que la delección del gen *egt* representa una estrategia alternativa muy interesante para aumentar las propiedades pesticidas del virus (O'Reilly y Miller, 1991) ya que los insectos infectados por el mutante *egt*- de AcMNPV dejan de alimentarse y consumen un 40% menos de alimento que los infectados con AcMNPV *wild type*.

Además de la reducción de alimentación, los análisis de la respuesta tiempo de infección-mortalidad indican que los insectos infectados con el AcMNPV (*egt*-) mueren más rápido que otros infectados con el *wild-type*. Estudios histopatológicos realizados sobre *Spodoptera exigua* infectada con AcMNPV (*egt*-) revelaron que se produce una degeneración temprana de los tubulos de Malpighi y que es esto lo que podría aumentar la velocidad de muerte del insecto (Flipsen *et al.*, 1995).

El rol del gen *egt* está involucrado entonces con la capacidad del virus de poder producir una mayor cantidad de OBs o progenie viral, asociado esto al efecto de prolongación del estadio larval y retraso de la muerte del insecto. Se ha observado que la cantidad de OBs generada en *Spodoptera frugiperda* infectada con el mutante AcMNPV (*egt*-) es menor que la generada con el *wild-type* (O'Reilly y Miller, 1991).

Estas observaciones se realizaron sobre insectos del último estadio y con altas dosis de virus. Si bien se sabe, que la producción de OBs aumenta también en larvas infectadas en los primeros estadios, no está claro aún qué sucede cuando se cambia de estadio y se utilizan dosis menores. Tampoco está claro aún si el incremento de la progenie se debe a un efecto significativo del gen *egt* en el contexto de una ventaja evolutiva. La degeneración de los túbulos de Malpighi comentada previamente no se observa en los insectos infectados con *wild-type*. El rol de la enzima en el ciclo viral no dependería de la completa inactivación de los ecdisteroides del insecto ya que se han observado algunos efectos *egt*-específicos a dosis en las cuales la muda no ha sido bloqueada. Incluso hay datos que sugieren que los ecdisteroides tienen un efecto inhibitorio directo sobre la replicación viral. Existen evidencias que apoyan la idea de que los ecdisteroides tienen un efecto adverso sobre la replicación en larvas (Keeley y Vinson, 1975) sumado a otros que demostraron

que la replicación de baculovirus se detiene durante el proceso de metamorfosis (Murray *et al.*, 1991). Los efectos de los ecdisteroides se dan sobre el control de transcripción de una amplia variedad de genes del insecto. Además dependiendo del tejido y del desarrollo del estadio la exposición a los ecdisteroides puede resultar en una inducción o supresión de la división celular. A cierto estadio de desarrollo el incremento de ecdisteroides seguido de una depleción en los títulos es señal para desencadenar la muerte celular programada de esas células (Robinow *et al.*, 1993; Schwartz y Truman, 1983). Claramente muchas de estas respuestas van en detrimento de la replicación viral en el insecto. Por tanto se encontraría cierta lógica a que la expresión del gen *egt* viral tenga significancia para contrarrestar los efectos adversos que provocan los ecdisteroides sobre la replicación viral a nivel celular.

Teniendo en cuenta los efectos producidos por EpapGV sobre el crecimiento y desarrollo larval de *E. aporema*, y en base a la información presentada aquí sobre el gen *egt* viral y la hormona ecdisona es que surge el interés en detectar su existencia en el genoma de EpapGV.

Al inicio de este trabajo de Tesis abordé la detección del gen *egt* de EpapGV para continuar con su caracterización a nivel molecular y funcional.

Materiales y Métodos

La metodología empleada en la purificación del DNA viral y en la obtención de las bibliotecas genómicas utilizadas para la detección del gen *egt*, fueron descritas en el Capítulo II. Aquí se describirán las alternativas de búsqueda del gen *egt*, su clonado, secuenciamiento, análisis de secuencia, expresión y su correspondiente determinación de actividad enzimática.

III. 1) Origen de las sondas heterólogas para la detección del gen *egt*

En principio, para realizar la búsqueda del gen de interés, se utilizó una sonda heteróloga correspondiente al gen *egt* de CpGV, cedida gentilmente por los Dres. Norman Crook y Doreen Winstanley (HRI, Wellesbourne, UK). El fragmento CpGV *Bam-K/Sal* -T, de 4,514 bp comprendía el gen *egt* (ORF 141) y otros genes flanqueantes: ORFs 140 (parcialmente), 142, 143 (me53) y granulina (Fig. 8). Para obtener los fragmentos que se utilizaron como sondas se realizaron dos digestiones independientes del inserto *Bam-K/Sal*-T con las enzimas *Bam*HI y *Bam*HI-*Sal*I, se sembraron en gel de agarosa 1% y luego los fragmentos liberados fueron eluidos del gel y purificados utilizando el *kit Gen-clean*.

La sonda heteróloga permitió seleccionar una sonda homóloga a partir de la genoteca *Bgl*II de EpapGV, la cual fue luego utilizada para la ubicación del gen *egt* en otras genotecas. Esta sonda corresponde al inserto clonado en pZErOTM-2, llamado fragmento N, el cual posee un tamaño de 0.75 kpb y, según se determinó con posterioridad, corresponde a la parte media del gen *egt* de EpapGV. El inserto N fue liberado por digestión del plásmido con las enzimas *Eco*R I/*Hind* III y luego purificado por *Gen-clean*. Esta misma sonda se utilizó en los ensayos de *Southern blot* y de análisis de la expresión del gen *egt* sobre RNA de larvas infectadas y no infectadas (*Northern blot*).

III. 2) Marcación de las sondas de DNA e hibridación

Las sondas heterólogas y homólogas fueron marcadas radiocativamente, por el método de *random priming* (Sambrook *et al.*, 1989) utilizando (α^{32} P)-dATP (Amersham-Pharmacia) como nucleótido marcado. Para detectar las secuencias del gen *egt* en las bibliotecas genómicas de EpapGV, se llevaron a cabo experimentos de *Southern* y *colony blot*. Los experimentos de hibridación fueron llevados a cabo utilizando condiciones muy estrictas para la sonda homóloga y menos estrictas en el caso de la sonda heteróloga. La temperatura de hibridación utilizada fue de 65 °C y 58 °C para la sonda homóloga y heteróloga, respectivamente. Los lavados fueron realizados con 6X SSC/ 0.1% SDS a la temperatura de hibridación y luego con 1X SSC/ 0.1% SDS a temperatura ambiente. Ambos lavados se realizaron por duplicado.

III. 3) Secuenciamiento del DNA

A partir de los resultados obtenidos en los análisis por *Southern blot*, se aislaron los plásmidos recombinantes conteniendo el gen *egt* de EpapGV, los que fueron mapeados y luego subclonados en pcDNAIII, pZErO y pBS. Las muestras a secuenciar fueron aisladas de cultivos a pequeña escala (*minipreps*) de las células *E. coli* Top10 utilizando el método de la lisis alcalina y luego purificadas por precipitación con PEG 8000 13% (Applied Biosystems, 1994). El DNA doble cadena fue secuenciado con Sequenase 2.0 (Amersham/Pharmacia) usando un equipo de secuenciación automática ABI 373. La secuencia se obtuvo utilizando *primers* estándar de T7 y Sp6 y también *primers* de EpapGV específicamente diseñados sobre secuencia *egt*-EpapGV conocida a partir de los secuenciamientos con los primers estándares (sintetizados por DNAgency, Malvern, PA, USA y Gibco-Life Technologies).

III. 4) Análisis de homología de las secuencias de los genes *egt*

Las secuencias de DNA obtenidas fueron analizadas con el programa DNASIS (Hitachi). Los análisis comparativos y las búsquedas en base de datos fueron llevadas a cabo usando los programas provistos por el servidor de internet NCBI-Blast (blast n y blast p) junto al paquete de programas del GCG Gap (GCG, Madison, Wisconsin). Los ORFs de *egt* y sus proteínas *EGTs* de los bancos de datos de NCBI, fueron comparados utilizando el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1974, 1994). Para la obtención de los perfiles de homología de todas las secuencias incluidas en este estudio se empleó una estrategia de corrimiento de ventanas parcialmente superpuestas para comparar las secuencias apiladas (programa desarrollado por Ghiringhelli PD). En esta estrategia se utilizaron como secuencias de entrada los mismos símbolos de consenso de Clustal X (*, : y .). Para los cálculos de homología de secuencias de ácido nucleico, el valor +1 fue asignado para residuos idénticos (en Clustal X, esto corresponde al símbolo * de la secuencia consenso) y el valor -1 fue asignado para residuos no idénticos.

Para el cálculo de homología de las secuencias de proteínas, el valor +1 correspondió a residuos idénticos y los valores +0.5 y +0.25 (los cuales en Clustal X están indicados con : y . respectivamente) en la secuencia consenso, para los diferentes grados de cambios conservativos basados en PAM 350 (Dayhoff *et al.*, 1974) y -1 para residuos aminoacídicos no homólogos. La suma de los valores asignados para cada residuo en cada una de las ventanas, fue dividida por el ancho de la ventana (33 residuos para ácidos nucleicos y 11 residuos para proteínas) y este resultado fue asignado a la posición central de cada ventana. El tamaño de las ventanas (33 y 11) fue seleccionado para poder comparar directamente ambos gráficos (el gráfico obtenido de las secuencias nucleotídicas de ORFs de genes *egt* y de las secuencias aminoacídicas de las proteínas *EGT*).

III. 5) Análisis filogenético

El análisis filogenético fue llevado a cabo usando también los programas Clustal X con el fin de generar múltiples alineamientos (Thompson *et al.*, 1974, 1994). Se obtuvo un árbol filogenético (sin raíz) derivado del método del *neighbor joining* (Saitu y Nei, 1987) con 1000 réplicas de *bootstrap*. El árbol fue generado con el paquete de programas que componen a PHYLIP (SEQBOOT, DNAPARS, PROTPARS y CONSENSE) versión 3.5, (Felsenstein *et al.*, 1996). Los números de acceso de las secuencias usadas en la generación de estos árboles filogenéticos fueron obtenidos de los bancos de datos y compilados en la Tabla 1.

Virus *	Accession number	Virus *	Accession number
AaIMNPV	gb AF204881.1	HezeNPV	gb U89958.1
AcMNPV	gb M22619.	HearNPV	gb AF000009.1
AgMNPV	gb AF313417.1	LdNPV	gb AF081810.1
BmNPV	gb L33180.1	LoGV	gi 1563726
BusuNPV	gb U61154.1	MbMNPV	gb U41999
CfMNPV	gb U10441.1	OpMNPV	gi 550530
CfDEFMNPV	gb U10476.1	PxGV	gb F270937.1
ChfuGV	gb AF058690.2	SeMNPV	gb AF169823.1
EppMNPV	gb AF052502.1	SplitNPV	gi 677862
EcoMNPV	gb AF107100.1	SplitNPV	gi 3297920

Tabla 1: Números de acceso de las secuencias aminoacídicas y nucleótidas.

ref. *:

AaIMNPV	<i>Amsacta albistriga</i> MNPV	(Arctiidae)
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> MNPV	(Noctuidae)
AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatilis</i> MNPV	(Noctuidae)
BmNPV	<i>Bombyx mori</i> NPV	(Bombycidae)
BsMNPV	<i>Buzura suppressaria</i> NPV	(Noctuidae)
CfMNPV	<i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV	(Tortricidae)
CfdefMNPV	<i>Choristoneura fumiferana</i> defective MNPV	(Tortricidae)
ChfuGV	<i>Choristoneura fumiferana</i> GV	(Tortricidae)
EppMNPV	<i>Epiphyas postvittana</i> MNPV	(Tortricidae)
EcoMNPV	<i>Ectropis obliqua</i> MNPV	(Geometridae)
HzeanNPV	<i>Helicoverpa zea</i> NPV	(Noctuidae)
HaNPV	<i>Heliothis armigera</i> NPV	(Noctuidae)
LdNPV	<i>Lymantria dispar</i> NPV	(Lymantriidae)
LoGV	<i>Lacanobia oleracea</i> GV	(Noctuidae)
MbMNPV	<i>Mamestra brassicae</i> MNPV	(Noctuidae)
OpMNPV	<i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV	(Lymantriidae)
PxGV	<i>Plutella xylostella</i> GV	(Plutellidae)
SeMNPV	<i>Spodoptera exigua</i> MNPV	(Noctuidae)
SplitNPV	<i>Spodoptera littoralis</i> MNPV	(Noctuidae)
SplitNPV	<i>Spodoptera litura</i> NPV	(Noctuidae)

III. 6) Expresión del gen *egt* en *E.coli*

Con el fin de obtener el polipéptido *EGT* en cantidad y pureza necesarias para obtener anticuerpos *EGT* específicos, se utilizó un sistema de alto nivel de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. El plásmido usado para *egt* fue el pRSET(C) (Invitrogen). El

mismo, se presenta en tres versiones (A, B, C, Figura 6) que permiten ubicar al gen de interés en marco de lectura continuo con el péptido de fusión.

La expresión de las secuencias de DNA clonadas en pRSET(A,B,C) se logra gracias a la presencia del promotor fuerte de T7 RNA polimerasa. La T7 RNA polimerasa reconoce específicamente a este promotor. Además, el inserto de DNA a expresar se posiciona *downstream* y en fase respecto del extremo N-terminal de un péptido de fusión. A su vez esta secuencia incluye un codón de inicio de la transcripción (ATG), una extensión de polihistidina que funciona como dominio de unión a un metal (para lograr la purificación de la proteína expresada de manera sencilla), una secuencia estabilizadora del transcripto del gen 10 del fago T7, el epítopo Xpress y un sitio de clivaje que reconoce una enteroquinasa.

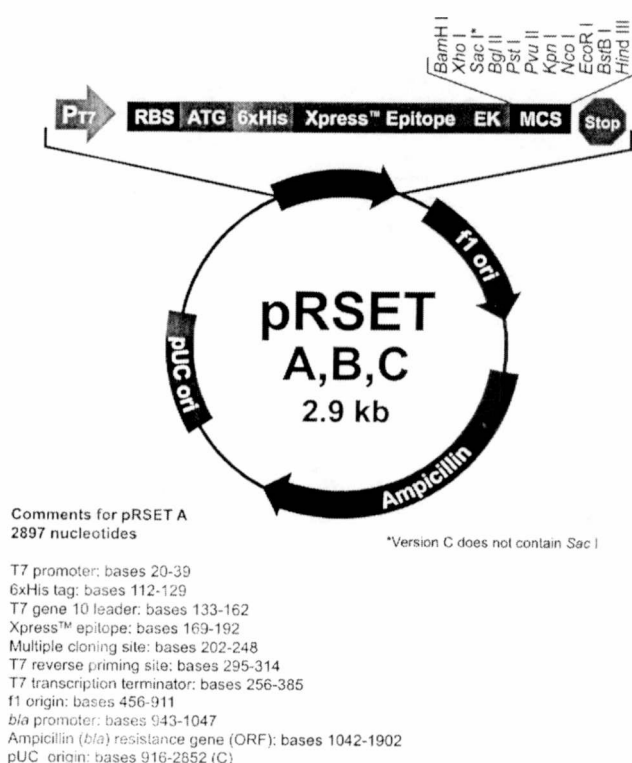


Figura III. 6: Mapa del vector de expresión de proteína recombinante en *E.coli*, pRSET A,B,C. La secuencia completa del vector se encuentra disponible en el sitio: www.invitrogen.com

Este sitio está ubicado entre el dominio de unión al metal y la proteína recombinante lo cual permite una fácil remoción del extremo N-terminal del péptido de fusión y libera la proteína purificada. Para la expresión del gen de interés es necesario inducir la expresión de la T7 RNA polimerasa mediante IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) o por infección de las células con un fago que exprese la polimerase. Una vez producida la T7 RNA polimerase, esta se une al promotor de T7 y transcribe el gen de interés. El fragmento insertado correspondió al gen *egt* completo amplificado con *primers* homólogos e insertado en los sitios *EcoR I*/*Hind III*.

III. 7) **Expresión del gen clonado egt de *EpapGV* en una línea de células de insecto**

Con el fin de asegurar la funcionalidad del gen *egt*, el gen se expresó utilizando ensayos de expresión transitoria. Para esto se diseñó un plásmido recombinante, que fue usado para transfectar células de *Spodoptera frugiperda* Sf 21. Para ello, el ORF completo del gen *egt* se clonó en el plásmido **pBS-hsp 70** y fue denominado **pBS-hsp-egt**.

El ORF completo del gen *egt* fue obtenido por amplificación usando la técnica de PCR a partir de DNA de *EpapGV* y *primers* homólogos diseñados a partir de la secuencia conocida y a los cuales se le adicionaron los sitios específicos de corte para ser insertados en el plásmido recombinante **pBS-hsp**, los *primers* fueron llamados:

Egt3'-Kpn: 5'-CGGGGT**ACCGATTGGACATTATATCAC**-3'

Egt5'-Eco: 5'-GGAATT**CCGCTCCAACATCAGTCATC**-3'

(Las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción están indicadas en negrita, mientras que las secuencias específicas del gen *egt* de *EpapGV* están subrayadas).

El fragmento amplificado fue digerido con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Kpn* I y luego ligado al **pBS-hsp-70** en los mismos sitios, utilizando el protocolo de ligación ya descrito.

El plásmido de expresión **pBS-hsp-egt**, contiene el ORF completo de *egt* de *EpapGV* que se encuentra bajo el control del promotor inducible *hsp-70* de *Drosophila melanogaster*, que fue insertado en los sitios *Xba* I-*EcoR* I del plásmido pBS-KS+. El promotor *hsp-70* fue obtenido del plásmido pAcDZ1 (Zuidema *et al.*, 1990) cedido gentilmente por el Dr. D. O'Reilly.

Para realizar el experimento de transfección, la línea celular de *Spodoptera frugiperda*, Sf 21 (Vaugnn, 1977), fue mantenida en medio TC100 (GIBCO/BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino (BIOSER, Nutrientes Celulares, Buenos Aires, Argentina). Las células Sf 21 (10^6 células por caja de cultivo de 35 mm) fueron transfectadas con 1 µg del plásmido recombinante **pBS-hsp-egt** usando los lípidos de transfección Tfx-20, de acuerdo al protocolo provisto por los fabricantes del kit (Promega, USA). Las células fueron incubadas a 28 °C durante 48 hs. Es conocido que la expresión de proteínas a niveles basales, bajo el control del promotor *hsp-70* ocurre de manera constitutiva, pero el nivel de expresión se puede aumentar si provocamos un *shock* térmico (Krebbs, 1999); por lo tanto, en nuestros experimentos, la expresión fue estimulada por incubación de las células a 42 °C durante 45 minutos, seguida de una incubación a 28°C durante 24 hs. Tanto las células como el sobrenadante del medio de cultivo fueron recogidos para realizar los ensayos de actividad de la enzima *EGT* o ecdisteroide UDP-glicosiltransferasa.

III. 8) **Ensayos de actividad de la ecdisteroide UDP-glicosiltransferasa**

La actividad del gen *egt* fue analizada por un ensayo de conjugación descrito por O'Reilly y Miller (1990), aunque éste fue levemente modificado en los tiempos de incubación. El

fundamento del mismo es que en presencia de la enzima *EGT* y los respectivos sustratos, se produce un conjugado de ecdisona que puede separarse del esteroide no modificado por su diferente movilidad en un ensayo de Cromatografía en Capa fina (TLC). Con el objeto de poder analizar esta actividad en lisados celulares complejos se utilizó la ecdisona marcada radiactivamente (^3H)-ecdysone de New England Nuclear, USA).

El ensayo de actividad se realizó sobre dos tipos de muestra (células Sf 21 y extractos de larvas de *E. aporema*), cuya procedencia se describirá por separado.

Una vez obtenida cada alícuota de muestra, el ensayo de actividad se realizó de la misma manera para todas las alícuotas obtenidas. Para esto se usó la (^3H)-ecdisona en presencia de los azúcares, UDP-glucosa o UDP-galactosa y una alícuota del extracto. Alícuotas de 10 μl del sobrenadante fueron incubadas durante 2 hrs at 37 °C, en un volumen final de reacción de 100 μl con 10 μl 10X TMM (1 M Tris, 1 M ácido maleico y 100 mM MgCl_2), 10mM UDP-glucosa, 10 mM UDP-galactosa y 1 μl 0.1mCi/ml (^3H) ecdysone (NENTM Life Science Products, Inc). La reacción de glicosilación fue detenida por el agregado de 2 volúmenes de etanol frío al 95%. Luego, la muestra fue concentrada hasta sequedad en SpeedVac (Savant) y resuspendida en 50 μl de etanol al 60% (v/v) en H_2O .

El conjugado fue detectado por cromatografía en capa fina y posterior autoradiografía.

III. 8-1) Ensayo de actividad en extractos de células Sf 21 infectadas y transfectadas

Las células post-transfección e inducción, fueron levantadas por “rastrillado” desde su recipiente de cultivo con 1ml de medio TC100, luego desintegradas utilizando un homogenizador Dounce. Luego esta mezcla fue centrifugada y el *pellet* fue descartado, conservándose el sobrenadante. Como control negativo de actividad de *EGT*, se usaron células Sf-21 no transfectadas y como controles positivos células Sf-21 infectadas con los nucleopoliedrovirus AcMNPV o AgMNPV, a diferentes multiplicidades de infección (1 y 0.1 pfu/célula).

III. 8-2) Ensayos de actividad de la ecdisteroide-UDP-glicosiltransferasa en larvas de *E. aporema*

Las alícuotas para la determinación de actividad fueron obtenidas de larvas en último estadio de *E. aporema* (infectadas y no infectadas). Las infecciones se realizaron con 1×10^5 OBs/ larva. Las larvas fueron tratadas siguiendo la metodología descrita por Hughes *et al.* (1986), que consiste en suministrar los OBs via oral. De igual manera se procedió con las larvas control, utilizándose agua en lugar de inóculo. Las muestras de larvas sanas e infectadas se tomaron a intervalos de 12 hs y hasta alcanzar las 84 hs post-tratamiento. Las mismas fueron homogeneizadas utilizando un homogenizador Dounce y la suspensión sometida a centrifugación a máxima velocidad en microcentrífuga durante 10 minutos. El sobrenadante fue posteriormente utilizado en los ensayos, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

III. 8-3) Cromatografía en capa fina (TLC)

Para llevar a cabo la separación de la (^3H) ecdisona libre de la (^3H) ecdisona conjugada, se realizó una cromatografía de capa fina utilizando placas de silica-gel 60 (Merck) y una mezcla de solventes orgánicos (n-butanol, acetona, ácido acético glacial, 30% NH_3 y agua (70:50:18:1-5:60 v/v)) como fase móvil. La corrida se realizó hasta alcanzar 1 cm previo al fin de la placa (3-5 hrs de tiempo de corrida). Las placas de TLC desarrolladas fueron secadas al aire y luego pulverizadas con el producto En^3Hance (New England Nuclear) que amplifica la señal de ^3H . La radiactividad fue detectada por autorradiografía y las imágenes fueron procesadas utilizando el programa *Kodak 1D Image* Análisis Software (Kodak).

III. 9) Análisis transcripcional del gen egt

Este análisis puede ser realizado mediante la utilización de diferentes técnicas o métodos. En nuestro caso se optó por realizar el análisis utilizando dos técnicas: determinación del extremo 5' del mensajero de *egt* mediante el uso de la técnica de *extension de primer* y la técnica de RACE (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds) para la determinación de ambos extremos. En principio, se detectó la cinética de expresión del gen *egt* viral, con el objeto de determinar si el mismo presentaba momentos de mayor o menor expresión a lo largo del proceso de infección. Para ello, se realizó un ensayo de *northern blot* sobre RNA total (de larvas infectadas y no infectadas), extraído a diferentes tiempos utilizando una sonda específica del gen *egt*. Con esto se determinó en qué momento era mejor tomar la muestra de RNA para realizar el resto de los estudios transcripcionales.

III. 9-1) Extracción de RNA total de larvas infectadas y larvas sin infectar

La extracción de RNA total a partir de insectos se realizó por el método de Chomczynski y Sacchi (1987). Para esto se tomaron 5 a 6 larvas, infectadas con una alta dosis viral (ver punto..III-8-2). La toma de muestras se realizó a diferentes tiempos post-infección: 0, 4, 8, 12 hs e intervalos de 12 hs hasta las 60 hs. Las larvas recogidas se trituraron en 300 μl de 1xTCG o solución de Chomczynski y Sacchi (isotiocianato de guanidinio 4M, citrato de sodio 25mM, sarkosyl 0,5% y 2-mercaptoetanol 90mM) y la suspensión resultante se centrifugó a 14000 rpm en microcentrífuga, durante 10 min. El sobrenadante se extrajo con fenol ácido (pH 4) y con cloroformo:isoamilico (24:1). El RNA total se obtuvo por precipitación de la fase acuosa en presencia de AcNa 0,3 M y 2,5 volúmenes de etanol 100%. El *pellet* de RNA se resuspendió en agua bidestilada estéril y conservó a -70°C . La estimación de la pureza y cantidad del RNA se realizó por medidas de absorbancia a 260 nm y 280 nm de longitud de onda y por observación visual en gel de agarosa.

El RNA fue analizado por electroforesis en geles de agarosa 1%, de tipo desnaturizante, en presencia de MOPS/formaldehído (Sambrook *et al.*, 1993).

Todos las manipulaciones de RNA se realizaron en determinadas condiciones para evitar la contaminación con RNAsas. En particular, todo el material relativo a la electroforesis del RNA se trató con una solución de SDS al 0.5% durante 30 minutos y luego se enjuagó por triplicado con agua destilada estéril.

Para la preparación de la agarosa y las muestras se siguió el siguiente protocolo:

<u>Preparación de la Agarosa</u>		<u>Preparación de las muestras</u>	
Agarosa	1.0 gr	muestra (4ug/ul)	4.0 μ l
MOPS 10X	50.0 ml	Formamida 2X	6.0 μ l
Formaldehído	10.0 ml	Formaldehido	1.8 μ l
Agua c.s.p 100 ml	40.0 ml	MOPS 10X	1.0 μ l
BrEt (20mg/ml)	0.5 μ l		

El formaldehído, se adicionó a la agarosa antes de volcar en el portageles cuando la temperatura de la solución no superaba los 50 °C. A las muestras se les adicionó *loading buffer* 6X (Promega, USA) y al momento de sembrar se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y luego se mantuvieron en hielo mientras se sembraron en el gel. La corrida del RNA se llevó a cabo a 80 Volts durante dos horas.

Luego, el gel fue transferido por capilaridad a una membrana de nylon (*Hybond-N+*, Amersham-Pharmacia). Para esto, el gel se lavó por triplicado con agua bidestilada estéril y luego se realizó la transferencia capilar en presencia de SSC 10X. La membrana de RNA transferido (*Northern blot*) se utilizó para detectar específicamente RNA virales por hibridación con sondas radioactivas. La sonda utilizada se preparo según se ha descrito en III-2, usando como molde el inserto *Bgl III* N de 0.75 kb. La temperatura usada en las etapas de prehibridación e hibridación fue de 60 °C.

III. 9-2) RACE

El RACE es una técnica rápida para lograr la amplificación de extremos de cDNA usando PCR. Esta técnica permite conocer el tamaño y la secuencia exacta de cada extremo no codificante de un RNA.

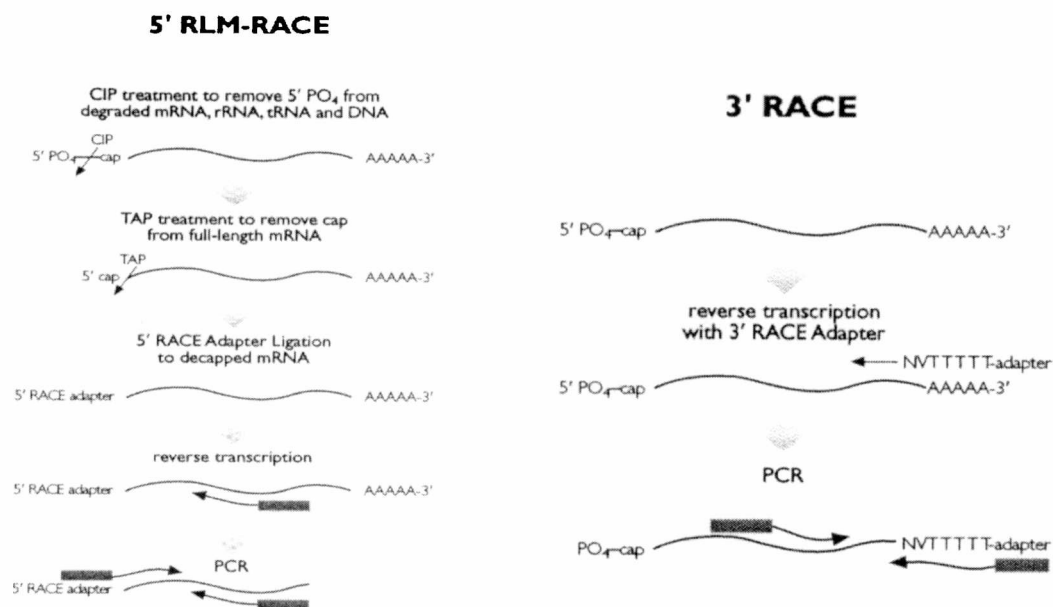


Figura III. 7: Esquema del fundamento metodológico para la determinación de extremos de un mRNA específico. Detalles del método y procedimiento pueden ser consultados en el sitio: www.ambion.com.

Para llevar a cabo estos experimentos se utilizó el *kit* RLM-RACE (Ambion) que representa un mejoramiento de las principales técnicas descritas para RACE (Maruyama y Sugano, 1994; Shaefer, 1995). RLM-RACE fue diseñado para obtener solamente cDNA completo desde el *mRNA* aunque este se encuentre capeado. Para realizar el ensayo se usó el RNA extraído como se describió, empleando los RNAs de larvas infectadas y no infectadas seleccionados a las 40 hs. También se diseñaron los primers *ad hoc* para cada uno de los extremos, dos por cada extremo (*primers inner* y *outer*) que fueron diseñados siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos se utilizaron para realizar la síntesis de los correspondientes cDNAs. Los *primers* para la determinación del 5'RACE fueron:

5'egt.outer: 5'-ggTAGATTgTACACCACCCTg-3'.

5'egt.inner: 5'-AgCTCgTCCATgTACgCgTTgAAAACCGAgT-3'.

En tanto que los primers diseñados para el extremo 3'RACE fueron:

3'egt.outer: 5'-TgCATCTACgATCTCCCACTAAgATgTgAgCT-3'.

3'egt.inner: 5'- ATCTCCCACTAAgATgTgAgCT-3'.

Los productos de amplificación obtenidos luego de la última amplificación por PCR, se clonaron en el vector pZERTM-2 en el sitio de inserción EcoR V. Se secuenciaron al menos 10 de los clones que dieron la amplificación del tamaño previsto y luego se analizaron las secuencias. El RNA total que se utilizó en estos experimentos fue tratado

con DNAsa para eliminar los posibles restos de DNA y asegurarnos de esta manera que toda amplificación fuera a partir del molde puro de RNA.

III. 9-3) Ensayo de Extensión de primer (Primer Extension)

Esta técnica permite conocer el tamaño exacto de la región 5' no codificante. Para el ensayo se sintetizó, a partir de RNA y con un *primer anti-sense*, una cadena marcada radiactivamente de cDNA utilizando como nucleótido marcado a ($\alpha^{32}\text{P}$) dATP (3000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$). El *primer* utilizado fue el 5' *egt.inner*. Luego el producto se precipitó con agregado de AcNa 3M y PAL 2.5 mg/ml para eliminar los nucleótidos no incorporados. El *pellet* se lavó con alcohol 70% frío, se secó y se resuspendió el pellet en buffer de siembra. La muestra fue resuelta en un gel al 6% de poliacrilamida-urea, desnaturalizante. Como marcador de tamaño del producto de extensión se utilizó una secuencia *leader* (realizada sobre DNA del gen *egt* utilizando el mismo *primer* que se usó para la síntesis del cDNA).

Resultados y Discusión

Identificación del gen *egt*

Para localizar el gen *egt* de EpapGV se utilizaron inicialmente sondas heterólogas del gen *egt* de CpGV. Se generaron dos sondas de diferente longitud a partir de un fragmento de DNA de CpGV clonado, las cuales diferían en longitud y, por lo tanto, en la cantidad de ORFs que contenían (Fig. III. 8, ver M&M).

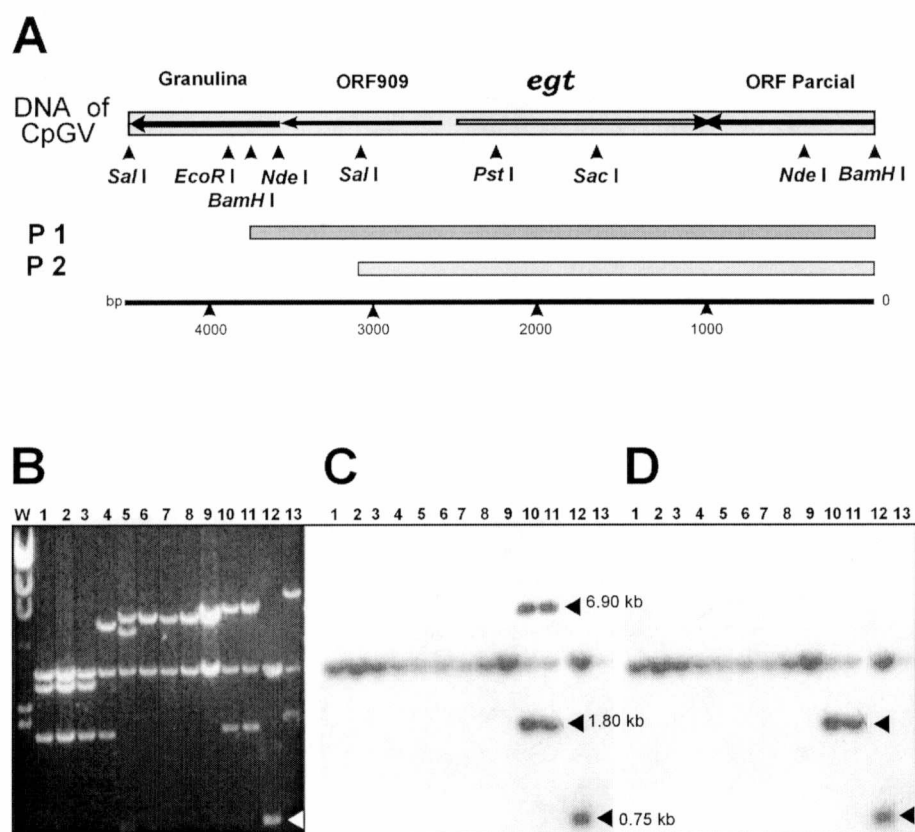


Figura III. 8: A) Mapa de restricción del fragmento de CpGV conteniendo el ORF completo del gen *egt*. P1 y P2 son los fragmentos de DNA derivados de este inserto de CpGV, que fueron usados para sondear al gen *egt* en las diferentes genotecas de EpapGV. B) Electroforesis sobre agarosa 1% (BrEt) de un grupo de clones de la genoteca EpapGV-Bgl II (digeridos con las enzimas EcoRI + Hind III; PM: calle 1: λ/ Hind III). C) Southern-blot usando la sonda P1. La señal positiva se observa en dos clones (indicados por las flechas). D) Southern-blot usando la sonda P2. La señal positiva se observa en los mismos clones pero en diferente posición (indicados por las flechas). El clon N, de 0.75 kb, fue seleccionado para ser usado como sonda homóloga en futuros experimentos.

La sonda P1 (correspondiente a las coordenadas 119813 - 820 pb del genoma de CpGV [32]), contenía los ORFs *egt*, ORF 909 (análogo del *me 53*) y *granulina*. La otra sonda, llamada P2 (nucleótidos 119813 - 122843), contenía al gen *egt* y al ORF 909. De esta manera, por hibridación con la sonda P1 (Figura III.8C) se localizaron las secuencias de *egt* y *granulina* en los fragmentos Bgl II N (0,75 kb) y Bgl II G (8.7 kb) respectivamente, mientras que la hibridación con la sonda P2 (Figura III. 8D) demostró que el gen de

granulina estaba contenido solo en el fragmento *Bgl* II G y una porción del gen *egt* en el fragmento *Bgl* II N. Además, se comprobó que el clon *Bgl* II contenía el gen homólogo a *me53* completo.

El análisis de la secuencia del clon *Bgl* II N mostró alta una homología con otros *egts* de baculovirus e indicó que la misma correspondía a la región central del gen de interés. Por este motivo, el fragmento de 0.75 kb clonado en *Bgl* II N fue seleccionado como sonda homóloga para buscar el gen *egt* completo de *EpapGV* en otras bibliotecas y utilizada en los diversos experimentos relacionados con su caracterización y expresión.

El gen *egt* completo fue localizado mediante un experimento de *colony-blot* sobre colonias de una genoteca parcial *EcoR* I - *EpapGV*. Los clones aislados, correspondientes al fragmento *EcoR* I E, 14.4 kb (Figura III. 9).

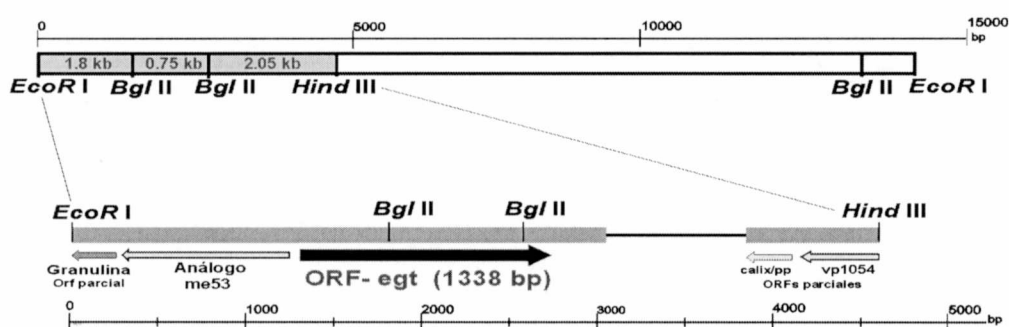


Figura III. 9: Mapa de restricción del fragmento de 14.4 kb *EcoR* I E (genoteca *EpapGV*-*EcoR*I) que contiene al gen *egt* de *EpapGV* completo. A partir del subclonado del fragmento *EcoR* I - *Hind* III [~4.6 kb] se obtuvo la secuencia completa del gen *egt* y sus regiones flanqueantes. En el esquema se indican también la ubicación y polaridad (mediante flechas) de los ORFs completos de: *egt* (gen completo y su tamaño) y el análogo del *me53*; ORFs parciales del gen de granulina, *vp1054* y *calix/pep*. En gris se muestran las secciones que han sido secuenciadas.

Para obtener el ORF completo del gen *egt* y debido al tamaño del clon *EcoR* I E, el mismo fue mapeado y luego subclonado. De esta manera se generó un plásmido recombinante (*pEGT-0*), que comprendía a la región codificante completa del gen *egt* y otros ORFs que flanqueaban al mismo. Este plásmido de 4.6 kb de extremos *EcoR*I/*Hind*III fue nuevamente subclonado para generar otros de menor tamaño que permitieran obtener la secuencia completa del gen *egt*-*EpapGV*. Los plásmidos obtenidos fueron llamados *pEGT-1* (*Hind* III/*Bgl* II; 2.05 kb), *pEGT-2* (*Bgl* II/*Bgl* II; 0.75 kb; que es una copia del *Bgl* II N) y *pEGT-3* (*Bgl* II /*EcoR*I; 1.8 kb) (Figura III.9).

De las 4.6 kb que fueron secuenciadas, un total de 1338 pb correspondieron al ORF completo del gen *egt*. Esta secuencia codifica para un polipéptido de 446 aminoácidos de largo con una masa estimada teóricamente en 51.4 kDa.(Figura III.10).

```

-200 TGGCGTAATTCACCAGAAAATTCATCACTTGCCTAGTTTCGTTGGATATAAATTTACTACGCACGTCATTGACACGATGTTTATTAATGTAATAGTGC
TATA INR
-100 GTGTGTGTGCGCGCACCACCAATATTATACACCGATTACATAAACGCACACATCGAATGTATATAAACCGCCACCGCGTGGCTCCAACATCAGTCATC
GC box TATA DAR INR TATA DAR INR
+1 ATGTGGACAGCGATCGTAGTTGTTTGGCCAGCAGCGCGCGCGCACAAATATCCTATGCGTGTTCACACACCGCATATAGTCACAACCTCGGTTTTC
1 M W T A I V V V L A S S A A A H N I L C V F P T P A Y S H N S V F
101 ACGCGTACATGGACGAGCTGGTAAAGGACGGTCACAATGTACAGTTATTACCACAATGCCAGAAACATTACATACATCACGCAAGTTGACTGCTCGTT
34 N A Y M D E L V K D G H N V T V I T T M P R N I T Y I T Q V D C S L
201 GCCAGGACACTATTCCAGGAATTGGTCAAAAACTCGACGATGATCAAGAAACGAGGCGTTGTGCGCAGACGAAACTACGGTAACCAAGGAAATACATG
68 P G H Y F Q E L V K N S T M I K K R G V V A D E T T V T K E N Y M
301 GGTGTGGTTGATATGGTGGTGGGAAATGCAACACGAAAATGTACGAGAGTTTTACAAAAGGACAGATGTTTGACTTGGTAGTGTGTAGGGGTATA
101 G L V D M V V R E M Q H E N V R E F L Q K D Q M F D L V V C E A Y
401 TTAGTTACATACTGGTGTGGGTATTGTTTAAAGGCGCCGTGATACAGTTTTCGTCGCTACGGATTGGTGGAAACTTTGAAACTATGGGTATTGT
134 I S Y I L V F G Y L F K A P V I Q F S S G Y G L V E N F E T M G I V
501 CGAGAGAAACCCCAATACACATCCCAACTTGTGGAGATCTTCGCAAAATGCTAGCTACGAGGCGATCTTCACCGAGAGTGGGCCATGCTTGAGCGGGG
168 E R N P N T H P N L W R S S Q N A S Y E A I L H R E W A M L E R A
601 CAACACGATATCATGCGGGATAATTACGGAACCGTGTACCCACTATGAAGAAACTGAGACAGCGCGTGTAAATGTTATTCATAAACGTCGCCGGCTATT
201 Q H D I M R D N Y G T R V P T M K K L R Q R V L M L F I N V P A I
701 TTGACAACAACAGCGCGGTCACTCCGATGGTGCAGTATTTGGCGGTATGCACTCTACGATCTCCCACTAAGGATGTGAGCTTCTTGGACAACACACAGAA
234 F D N N R P V T P M V Q Y F G G M H L R S P T K D V S F L D K H K N
801 TGTGGTGTACGTGAGCTTTGGTTCTAGCATAGACCGATGGAATGGACAGTGGGTGATTGGTGAGTTTGTGAGGCGTTTGTCTCGGGTCCGTATATG
268 V V Y V S F G S S I D A M E M D S G L I G E F V R A F A R V P Y M
901 GTGTTATGGAAAATATCCAACAACGTTTCGAGATTATACAATGTGCTAGCAACGTGATAATTAGGGAATGGTTTCCGCAAGAGACATATTGAATCAG
301 V L W K I S N N V R D L Y N V S S N V I I R E W F P Q R D I L N H
1001 CTAATGTTAAGCTGTTTATTACTCAGGGTGGTGTACAATCTACCGATGAAGCGATAGATAGCTGTGTGCCCTTGTGCGGAATACCCATGGTGGCGATCA
334 A N V K L F I T Q G G V Q S T D E A I D S C V P L L G I P M V G D Q
1101 GTTCTACAACACGGGCGATATGTGAGTCTAAAAATCGGACAAAAGATTGACGTTTACGTTCTAGAACAGGAAGAGTTGGCCCTAAAAATTATGGATATG
368 F Y N T G R Y V S L K I G Q K I D V L R L E Q E E L A L K I M D M
1201 GTACAAAACCATAGTTATTACAAGAATAATTTAATACAACTTAAGAGTTATATTAACGACAACAGCATGACTTCGTTGAAGAGATCTGTTATTCACCAAT
401 V Q N H S Y Y K N N L I Q L K S Y I N D N S M T S L K R S V I H Q
1301 TTGTGTTGAGAAATAAAATATTTTGTACTACCATAAAATAAATAAACGATAAAAAACAATACACTTGTATATAATTTTTGTATGACCGAAATAAAATG
434 F V L R N K I F L Y Y H K
1401 GATATAATGTCCAATCTGGAAATATAAACTTTTGATTTTATAATTCAGATTGGACATCATGTGTGATAAATTAAGTTTGTGTATAAATTTTTATATGGG

```

Figura III. 10: Secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen *egt*. El ORF completo del gen *egt* está incluido en las 1700 pb que se muestran en el gráfico. Los codones de iniciación y terminación se distinguen coloreados en recuadros amarillos y en negrita. Los posibles elementos característicos de promotores (tempranos) están también en recuadros especialmente marcados (ej: TATA box, UAR, INR and DAR) DAR indica motivos CACNG de la región activadora downstream, GC es un motivo comúnmente encontrado en los UAR. Las secuencias motivo asociados a los sitios iniciadores de la transcripción se marcan con INR (Friesen 1997; Jehle & Backhaus, 1994). Los primers que fueron utilizados para amplificar al gen *egt* completo están subrayados. La secuencia N-terminal grisada de la proteína, indica el putativo péptido señal

El análisis de la zona *upstream* de la secuencia del ORF del gen *egt* (Fig. 10), reveló la presencia de varias zonas que según la bibliografía son posibles “TATA boxes”, a la altura de los nucleótidos -154, -78 y -38. Además de estos tres posibles elementos TATA, es posible encontrar otros elementos consenso que fueron seleccionados sobre la base de su posición relativa respecto de las secuencias consenso de sitios de inicio de la síntesis del mRNA (INR). Los TATA boxes marcados en la posición -154 y -78 no son TATA boxes canónicos, pero también se ha visto que en algunos genes de baculovirus y sus respectivos huéspedes, existen promotores TATA box negativos [Kogan et al., 1995; Friesen et al., 1997].

Los motivos INR (iniciadores de la transcripción) fueron encontrados en las posiciones *upstream* -135 (CATT), -61 (CATA) y -8 (CAGT). En la mayoría de los genes tempranos

de baculovirus, los elementos TATA box y e INR box se encuentran a una distancia de 21 a 30 nucleótidos, aunque en algunos casos estas secuencias consenso se han informado a 17 nucleótidos de distancia [Jehle y Backhaus, 1994].

En nuestro análisis teórico, el *motivo* CAGT ubicado en la posición -8, resultaba ser un INR típico ubicado dentro de un contexto de secuencia también muy conservado pero su distancia tan corta al ATG hizo dudar sobre la funcionalidad del mRNA con una región no codificante tan reducida. Si bien hay autores que han informado la existencia de una secuencia líder muy cercana al ATG para ciertos genes de expresión tardía de baculovirus, (genes *Ubiquitina* y *Enhancin*; Roelnik et al., 1995; van Strien et al., 1996), no existen reportes similares para genes tempranos. El cuestionamiento de la existencia de tal mRNA condujo a la determinación experimental de la zona *upstream* utilizando otros métodos adicionales al análisis teórico (ver más adelante).

Se encontraron también secuencias del tipo DAR o *Downstream Activating Region* que son secuencias consenso ubicadas *downstream* de los INR y cuya función es activar el proceso de transcripción. De este análisis surge que el INR de la posición -135 tiene un potencial sitio DAR con la secuencia consenso que comienza en el nucleótido -72, y el probable INR de la posición -61 tiene su elemento consenso DAR a partir del nucleótido -27.

Entre las posiciones -104 y -87 detectamos un tramo de secuencia de 18 nucleótidos con residuos guanina/pirimidina alternados similar a la descrita para una UAR o *Upstream Activating Region*. En algunos genes tempranos de baculovirus se han detectado secuencias regulatorias que incluyen *motivos* del tipo a/ctcGTGTnc/t y GCGCGC (elementos GC) [Friesen y Miller, 1997], lo cual es coincidente con este resultado.

Todas estas observaciones permiten especular una serie de posibilidades sobre los probables sitios promotores e iniciadores del gen *egt* y sobre la temporalidad de su expresión. Las mismas fueron evaluadas mediante experimentos se presentan mas adelante

Comparaciones de los EGTs de Baculovirus

La secuencia de aminoácidos predicha para EGT-EpapGV tiene un 53% de identidad y un 76% de similitud con la más relacionada de las EGTs de granulovirus, la EGT de LoGV (*Lacanobia oleracea* GV).

Para la comparación de secuencias del producto del gen *egt-EpapGV* con el resto de las EGTs publicadas para baculovirus en el GenBank, se encontraron valores de identidad en el rango del 33 al 49 % y de similitud entre el 53% y el 70%.

En la Figura III. 11 se grafica el resultado de los alineamientos de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de *egt* publicadas. La similitud a nivel nucleotídico es

relativamente modesta comparada con la similitud que se observa para la secuencias de aminoácidos, con la aparición de clusters de alta similitud en regiones muy conservadas y que se han designado con números del 1 al 6.

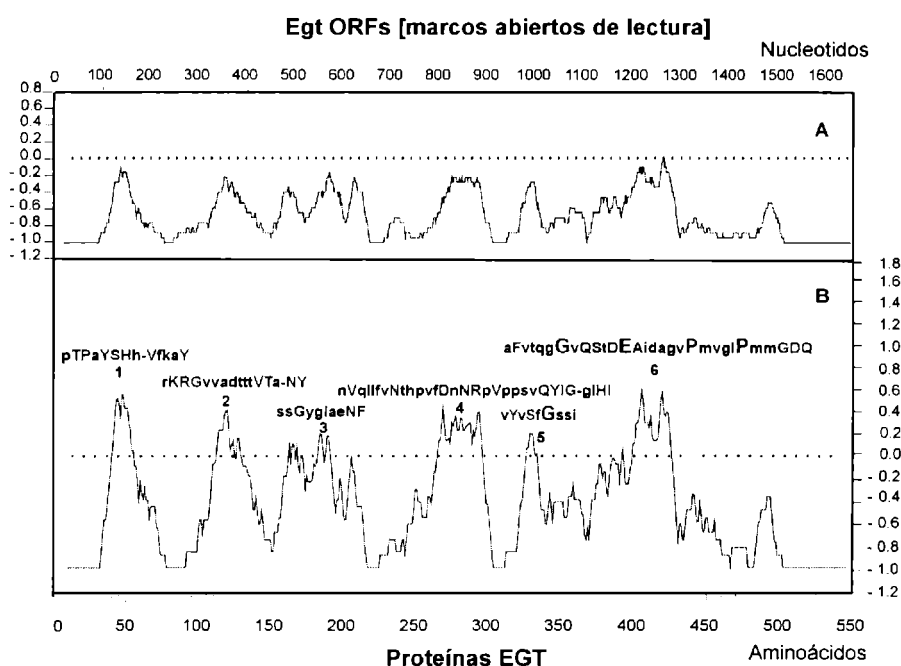


Figura III. 11: Similitud relativa entre secuencias, el grado de similitud relativa fue calculado como se describió en los M&M. El resultado para secuencias nucleotídicas y aminoácídicas de *EGT* se muestra en los paneles A y B respectivamente. Los números 1 a 6 indican las regiones mas conservadas [picos significativamente mayores a cero]. Asimismo se indican las secuencias correspondientes encima de cada número. Letras mayúsculas en rojo indican residuos considerados invariables en todas las *EGTs*. Letras en mayúsculas indican residuos conservados en todas las secuencias y letras minúsculas indican el residuo predominante en el apilamiento.

Estos resultados coinciden con otros presentados previamente y en los cuales se usaron menor número de secuencias para realizar los alineamientos [Riegel et al, 1994; O'Reilly et al., 1992].

Por otro lado, O'Reilly [1995] había identificado siete residuos absolutamente conservados en todas las *EGTs* analizadas en ese momento. Si bien estos siete residuos están presentes en la proteína *EGT* de *EpapGV*, solo cinco de ellos están insertos en los bloques de secuencia conservada 1 a 6 descritas por O'Reilly. Según el mismo autor, estos aminoácidos son esenciales para la actividad enzimática y serían críticos en la unión al UDP-azúcar. No obstante esto, cuando se analizaron todas las secuencias actualmente disponibles sobre *EGTs* de baculovirus, se encontró un número mayor de residuos aminoacídicos muy conservados. Existen 53 residuos totalmente conservados (sobre un total de 601 residuos, que incluye los *gaps* del alineamiento múltiple) que apoyarían la hipótesis de que estos residuos pueden jugar un papel muy importante en el mantenimiento de la estructura o función de la proteína *EGT*. El hecho de que estos 53

residuos hayan permanecido invariables durante el proceso de evolución, amerita que deban ser analizados en futuros experimentos que apunten a confirmar o deshechar el papel estructural o funcional que se les asigna.

Previamente se había informado que *EGT* de *AcMNPV* es secretada al medio y que posee en su extremo N-terminal una secuencia señal de 18-aminoácidos de largo que la conduciría hacia el compartimiento extracelular. Luego este péptido señal es eliminado para producir la proteína madura [O'Reilly et al., 1992]. El alineamiento de las *EGTs* baculovirales conocidas al momento, muestra que todas ellas poseen secuencias hidrofóbicas en su extremo N-terminal, que se asemejan al péptido señal comentado, lo que efectivamente sugiere que todas las *EGTs* pueden ser secretadas.

Por otra parte se definió la posible secuencia de clivaje de la proteína *EGT* en *EpapGV* (Figura III.12).

EpapGV	MWTAIVVVLASS-AAA	HNILCVFPTPA
ChfuGV	MFVQLILVVLAPCFVCS	SNILCVFPTPA
LoGV	MFISILLALAVERIC	ANILCVFPTPA
ClGV	IFVVLCCCAAYN-DA	ANILCVFPTPA
PxGV	MTLKLILFLGAAN--S	ANILCVFPTPS
EcoMNPV	MSSSQIRFLFGIIVVFCCLCCWSAARS	ANILAYFPTPS
LdNPV	MRSRFDRAPRNDVTPKASGQVRGDPSPRARGLYKYGTRGRPSLVDDSTRNDTMTAYLILSTLTAVNA	ANILAVFPTPA
AcNPV	MTILCWLALLSTLTAVNA	ANILAVFPTPA
OpNPV	MVFLIIALTLLA--ADAQT	ANILAVLPTPA
ChfuNPV	MASLLIALTLLA--AQAH	ANILAVLPTPA
EppoNPV	MHFAVLLTLTAAAAAAAVIPLIQ	ANILAVFMPV
AaNPV	MFCNDLFLKPLFLIATLSCGITLTAAAAAAAVIPLIQ	NILAVFMPV
BmNPV	MTILCWLALLA--TGARA	ASILAVLPTPA
SplitNV	MKMIILLVFLSVLDG	ARILCVFPVPS
HearNPV	MYKQIITMLLVFLSVLDG	ARILCVFPVPS
HezeNPV	MYKQIITMLLFALTGSAVSA	ARILAVFPTPA
SeNPV	MNGCAVLILFLCLVMVHQH	VRILAVFPTPA
SliNPV	MKMIILVVLHALLNSAA	VRVLCMFPTPS
MbNPV	MGHLHIVHWRLTMNG--AIAALFLWLAKQCHG	AKILAVMPTPS
BuzuNPV	MYLLIIFVCVQYIDNVGG	AKLLAIFPTPS

Figura III. 12: Alineamiento de secuencias de los extremos N-terminal de las proteínas *EGT* de Baculovirus. Con una flecha se indica la posible señal del sitio de eliminación del péptido señal, basado en la secuencia aminoacídica de la proteína madura de *EGT* del virus *AcMNPV*.

Para la proteína *EGT-EpapGV*, se encontró un potencial sitio de clivaje ubicado entre los aminoácidos 15 y 16 (Fig. III.10), además, del análisis de las secuencias de *Egts* se observa que a partir del potencial sitio de clivaje la similitud entre secuencias aumenta abruptamente [Clarke et al., 1996], mientras que la zona que corresponde al sitio de clivaje muestra alta heterogeneidad en secuencia y tamaño.

Relaciones Evolutivas de los genes *egt's*

Las relaciones evolutivas de los genomas pueden ser analizadas desde diferentes perspectivas: estructura genómica y orden de genes, presencia o ausencia de genes homólogos, grado de similitud de determinados genes, etc. Si bien la información

disponible respecto a los *Granulovirus* es muy limitada cuando se la compara a la de *Nucleopolyhedrovirus*, es posible realizar el análisis de algunas de estas relaciones.

Desde el punto de vista del orden de genes, *upstream* del gen *egt*-EpapGV, encontramos un gen homólogo al *me53* y al gen de la *granulina* (Fig.8A). El orden y la orientación del DNA de EpapGV en la región vecina al gen *egt*, es análogo al que se observa en otros granulovirus tales como in CpGV, CIGV, ChfuGV and PxGV, en los cuales *upstream* de la secuencia del gen *egt*, aparecen en dirección opuesta, *granulina* y el homólogo del *me53* [Hashimoto et al., 2000; Smith y Goodale, 1998; Jehle y Backhaus, 1994; Goto et al., 1985]. PxGV tiene tres ORFs adicionales relativamente pequeños insertados entre el *me53* y la *granulina*, y tiene además un ORF que está en la misma posición en el DNA de ChfuGV; aunque no hay información que pueda confirmar su estado funcional.

Otro aspecto para comentar es que en la mayoría de los genomas, se describe a *egt* separado de *granulina* por aproximadamente 0.9-1.2 kb; sorprendentemente, en el DNA de LoGV, el cual posee el gen de *egt* con mayor porcentaje de similitud al DNA de EpapGV, se observa que la distancia es de casi 8 kb (con lo cual se podrían ubicar en esta distancia, muchos más genes que los que se han descrito en los genomas de GV's mencionados previamente).

Smith & Goodale (1998) sugirieron que el gen *egt* de LoGV *egt* es transcripto principalmente bajo un promotor tardío. Sin embargo, el análisis de la región *upstream* del gen *egt* de *EpapGV* reveló una serie de motivos, característicos de promotores baculovirales tempranos y coincidentes con lo descrito para la mayoría de los genes *egt* de baculovirus (Fig. III.10). A su vez, se ha informado expresión temprana de genes *egt* en varios procesos de infección de células por parte de NPV [O'Reilly y Miller, 1990; Barret et al., 1995; Factor et al., 1995; Riegel et al., 1994; Goto et al., 1985]. Acorde con estos resultados, nuestros estudios preliminares, realizados sobre larvas de *E. aporema* en su último estadio, a diferentes tiempos post infección indicaron que el *egt* de EpapGV es expresado tempranamente (4 hs post-infección) y que sus niveles de expresión permanecen altos hasta el final de la infección.

Clarke et al. (1996) habían propuesto que el gen *egt* estaba presente en todos los baculovirus. Sin embargo, un análisis reciente de la secuencia del genoma de *Xestia c-nigrum* GV, demostró que este virus no posee un gen homólogo al *egt*.

El análisis filogenético de GV's, basado en las secuencias de *granulina*, agrupa a estos virus en dos *clusters*, uno que incluye a HbGV, CIGV, ChfuGV, CpGV, PbGV (grupo I), y otro que incluye a: XcGV y TnGV (grupo II). Bideshi et al. (2000) sugirieron que los GV's evolucionaron desde el grupo I hacia el grupo II y que esa evolución estaría relacionada también con la filogenia del huésped.

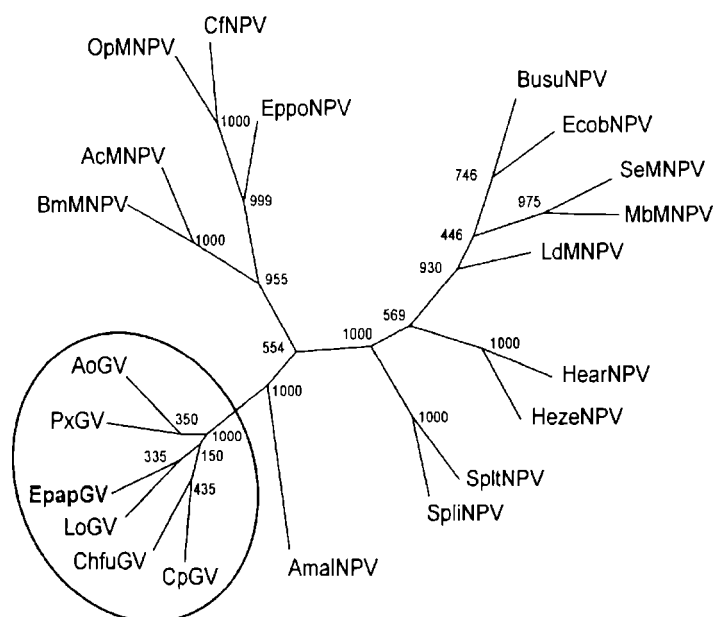


Figura III. 13: Árbol filogenético basado en la secuencia de 21 proteínas *EGT* de Baculovirus [los números de acceso de cada proteína se muestran en la Tabla I]. El árbol se obtuvo aplicando los programas Seqboot, Protpars, Consense y Drawtree [paquete de programas de *Phylip*] al resultado de un apilamiento múltiple obtenido con el programa Clustal X. La consistencia [sobre 1000 replicaciones de bootstrap] se indica sobre cada nodo. En amarillo se indica el cluster de GV que resulta de utilizar la proteína *EGT* para realizar este análisis filogenético.

Nota: cuando esta tesis ya estaba concluida se informaron nuevas secuencias de EGTs, correspondientes a *Ph. Operculella* GV, *R.nu* NPV y *M. configurata* NPV. Con estas secuencias adicionales se volvió a realizar el árbol filogenético. Dado que la forma y consistencia del mismo permaneció igual al presentado en la Figura 13, no se procedió al cambio de la figura.

Nuestro análisis filogenético fue hecho utilizando secuencias de proteínas de *EGTs* disponibles en el Genbank (NCBI). *Egt* es el gen baculoviral auxiliar del cual existen más cantidad de secuencias disponibles, después de los genes de *granulina* y *poliedrina*. No obstante las secuencias disponibles del gen *egt* de GV son sólo seis.

El árbol generado usando el método de máxima parsimonia (Fig. III. 13) sugiere que los GV están agrupados en un solo *cluster* y separados de dos grupos diferentes de *Nucleopolyhedrovirus*. La débil consistencia del cladograma no permite especular demasiado sobre la inserción y relación del gen *egt* de *EpapGV* con el grupo I de GV. En líneas generales se puede confirmar que nuestros análisis filogenéticos coinciden con los resultados de otros investigadores que han generado árboles usando como base la proteína principal del cuerpo de oclusión (*granulina* o *poliedrina*) [Zanotto et al., 1993]. Clarke et al. [1996] obtuvieron resultados y conclusiones similares a las mostradas aquí, sobre la base de las muy pocas secuencias de *EGT* disponibles en aquel momento.

Finalmente, se observa que los árboles filogenéticos muestran diferentes patrones según el gen ó segmento genómico que se analice; por lo tanto es razonable especular que los genomas de baculovirus que fueron analizados son resultado de vías independientes de

una adquisición horizontal de genes. Esto resulta mucho mas evidente cuando se analizan las secuencias de los genomas completos que hay disponibles (Herniou *et al.*, 2001). La divergencia está bajo la coacción de dos importantes factores, la preservación de la actividad biológica y los procesos adaptativos a nuevos huéspedes. Entonces se podría pensar que las características biológicas de *EpapGV* y sus secuencias relacionadas son coincidentes o similares a la de los GV's provenientes de la mayoría de los tortricidos.

Expresión de EGT en *E. coli*

El gen *egt* de *EpapGV* fue clonado y expresado en *E. coli* (ver M&M). Mediante un análisis de *Western-blot*, se detectó un polipéptido con un tamaño aparente de 52.5 kDa (Fig. III.14).



Figura III. 14: En la figura se muestra el resultado del *western-blot* realizado sobre el producto de la expresión de la proteína EGT en *E.coli* (con y sin inductor IPTG). Asimismo se detalla la secuencia del sitio de clonado múltiple del pRSET-C donde fue insertado el ORF de *egt*, el sitio de clivaje se encuentra indicado en la secuencia con una punta de flecha.

Este peso es comparable al estimado teóricamente 51.4 kDa y la pequeña diferencia que se observa en el *western-blot* se debe a la cola de polyhistidina que proviene de la inserción en pRSET-C.

Esta proteína se utilizará para producir anticuerpos específicos para la detección de EGT en larvas infectadas con *EpapGV*.

Expresión transitoria del gen *egt* en células de insecto Sf21 y actividad enzimática de EGT

Motivados en que el análisis de secuencia *upstream* del gen *egt* presentaba ciertas particularidades en cuanto a estructura, se decidió evaluar la funcionalidad del gen *egt*.

Para realizar el ensayo de expresión del gen *egt*, se construyó un plásmido que contenía el ORF completo del gen *egt* bajo el control del promotor inducible por temperatura *hsp70* de *Drosophila melanogaster* (Fig. III.15). Este plásmido fue usado para transfectar las células de insecto *Sf21* como se ha descrito en los M&M.

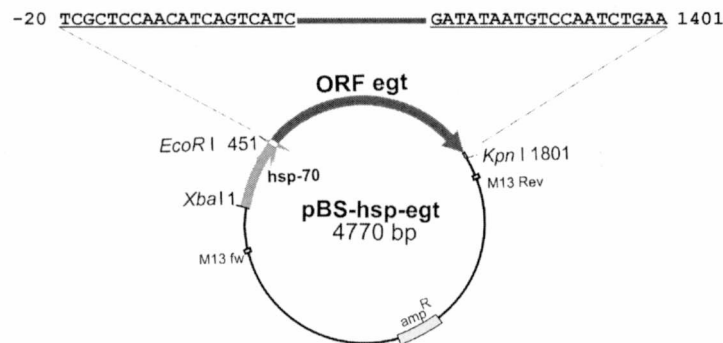


Figura III. 15: Esquema del plásmido de expresión, llamado pBS-hsp-egt y construido a partir de pBlueScript KS+ y el *heat shock* promoter 70 de *Drosophila melanogaster*. El ORF completo de *egt* se amplificó por PCR (en el esquema se muestran las secuencias de los primers usados, M&M) y se insertó en los sitios *EcoR* I y *Kpn* I. Este plásmido fue utilizado en los ensayos de expresión transiente.

El ensayo de actividad reveló que la proteína *EGT* expresada en las *Sf-21* transfectadas se exportaba al medio extracelular y era funcionalmente activa. Para este ensayo se utilizó [3 H]-ecdisona como sustrato y el producto de la conjugación se analizó por cromatografía en capa fina (Fig. III.16). Como control positivo y negativo se tomaron extractos y sobrenadante de células infectadas con AcMNPV (que posee un gen *egt* funcional) y células *Sf-21* sin infectar respectivamente.

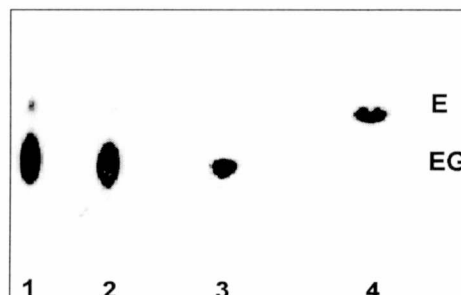


Figura III.16: Ensayo de Ecdisona glicosil transferasa. El medio sobrenadante de células infectadas, transfectadas y sin infectar fue utilizado para detectar la actividad enzimática de la enzima *EGT*. Los productos de la reacción fueron resueltos mediante TLC y luego detectados por autorradiografía. Los productos se identifican con **E** [3 H]-ecdisona libre]; **EG** [3 H]-ecdisona glicosilada]. Las calles 1 y 2, muestran el resultado de la transfección con el plásmido pBS-hsp-egt usando diferente relación de plásmido:lipido de transfección [3:1 y 4:1 respectivamente]; la calle 3 es el control positivo [células *Sf-21* infectadas con 1pfu/cél de AcMNPV] y la calle 4 es el control negativo [células sin infectar].

Este es el primer estudio en el cual se demuestra la existencia de un gen *egt* funcional de un granulovirus por experimentos *in vitro*.

Si bien la información disponible en el banco de secuencias de *EGTs* de baculovirus es muy amplia, alcanzando a 25 *EGTs*, la actividad enzimática ha sido demostrada solamente en seis de los genes publicados, siendo todos ellos provenientes de NPVs. En esos experimentos, la actividad *EGT* fue expresada y luego demostrada, utilizando métodos de infección ó transfección-coinfección [plásmido *egt* y DNA viral Δegt ; O'Reilly y Miller, 1989, 1990; Rodríguez et al., 2001; Toister-Achituv y Factor, 1997; Clarke et al., 1995; Barret et al., 1996].

Además, por ensayos de actividad que se realizaron con el medio sobrenadante de la transfección y con lisados de células por separado, se determinó que la enzima es secretada al medio de las células transfectadas. Estos resultados son coherentes con el análisis teórico de la secuencia aminoacídica que indica la presencia de un péptido señal para la exportación de la proteína.

Actividad enzimática de *EGT* en larvas de *E. aporema* infectadas y sin infectar de último estadio

Con la intención de demostrar efectivamente la funcionalidad y efectos del gen *egt* *in vivo*, se realizó un ensayo en el cual se tomaron larvas infectadas y sin infectar, de ultimo estadio [y recién mudadas] las cuales a diferentes tiempos post-muda fueron procesadas. En el extracto obtenido se realizó el ensayo de glicosilación como ya se ha descrito, los resultados se muestran en la Figura III. 17:

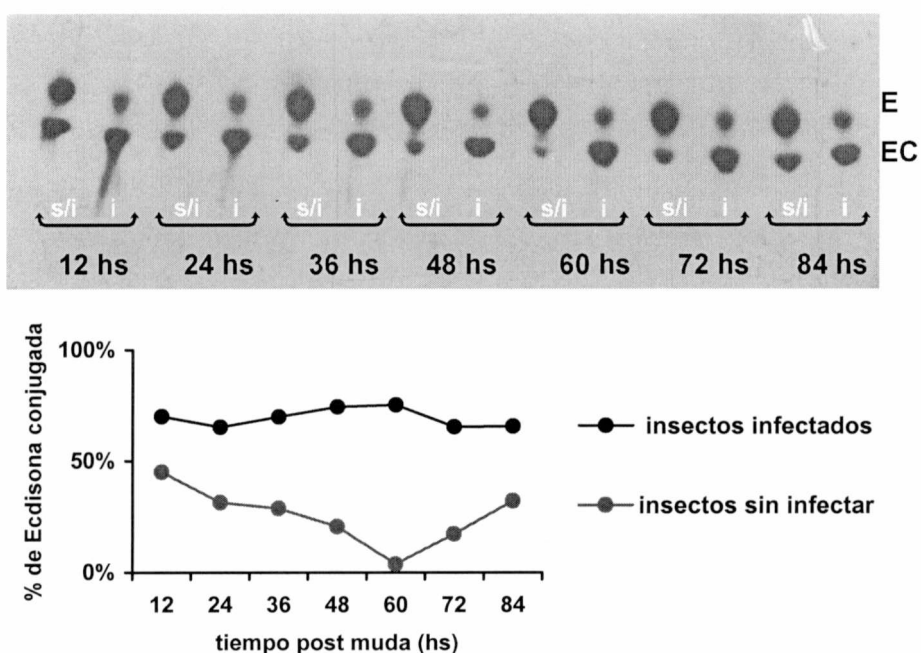


Figura III. 17: Actividad *EGT* en insectos infectados y sin infectar; en A se observa la autorradiografía de la TLC del ensayo realizado sobre larvas infectadas y sin infectar [E: [³H]-ecdisona libre]; EC [³H]-ecdisona conjugada]. En B se grafican los resultados obtenidos en A, como % de EC vs tiempo post muda.

Si bien se han publicado datos sobre el nivel de ecdisona conjugada (EC) en insectos infectados, y se ha demostrado que se debe a la expresión del gen *egt* viral, no hay informes en los que se haya demostrado la presencia de EC en insectos **sin infectar**. Este es el primer ensayo que demuestra la existencia de cierta “actividad similar a *EGT*” en larvas sin infectar y sugiere que la conjugación de los ecdisteroides con oligosacáridos podría ser un mecanismo para la regulación de sus niveles en insectos.

El resultado obtenido muestra un alto nivel de porcentaje de conjugación de ecdisona en los insectos infectados, que se mantiene elevado a todos los tiempos post-muda. Para los insectos no infectados se observa que al inicio de la muda, la ecdisona se encuentra principalmente glicosilada para luego descender abruptamente hasta que a las 60 hs se detecta un mínimo de conjugación. A partir de ese momento la conjugación de la ecdisona vuelve a aumentar coincidiendo esto con el momento de realizar una nueva muda. Los tiempos de muda de *E. aporema* son descriptos por Goldberg *et al.*, 2002.

Expresión del gen *egt* en función del tiempo post-infección

Como se comentara previamente, el análisis teórico de la secuencia *upstream* del gen *egt* no era suficiente para determinar el comienzo de la transcripción y su temporalidad. Por ello, se planificaron experimentos de cinética de expresión, extensión de *primer* y RACE. Los resultados de la cinética de expresión se muestran en la Figura III.18.

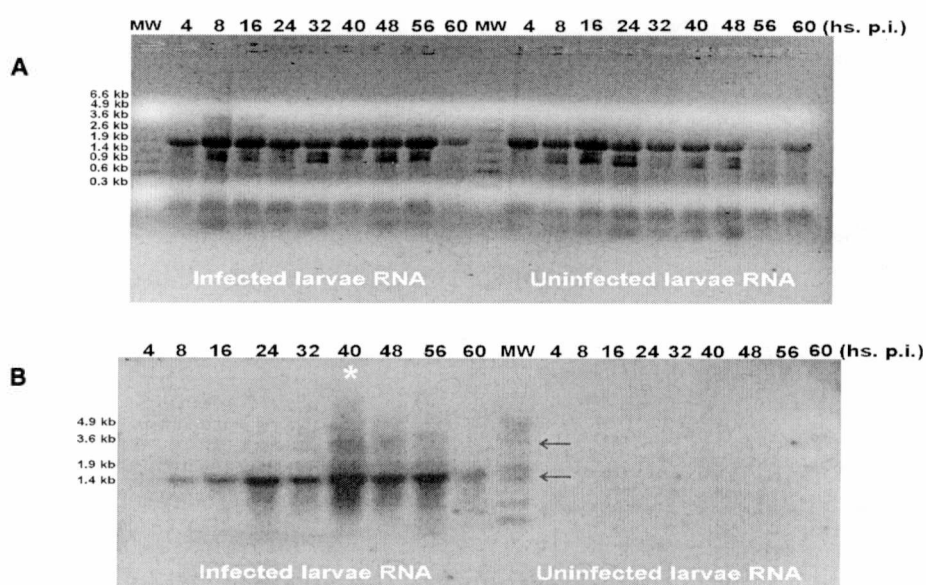


Figura III. 18: Cinética de expresión del gen *egt*; Northern blot realizado sobre RNA total extraído de larvas infectadas y sin infectar. A, gel de agarosa desnaturizante 0.7 % teñido con BrEt. B, Northern-blot. La sonda utilizada [clon N, genoteca Bgl II-EpapGV] demostró la presencia de dos transcritos específicos de *egt*. Uno principal de ~1.4 kb y otro secundario, a las 40 hs post-infección [marcado con *].

Para la detección se utilizó como sonda específica de *egt-EpapGV*, al clon *Bgl* II N (0.75 kb) en condiciones estrictas de hibridación. El resultado de este *Northern*, mostró que la hibridación era positiva para las muestras proveniente de larvas infectadas y negativa para el caso de las larvas control no infectadas.

A partir de las 4 hs post infección, se detectó el *mRNA* del gen *egt*, y la señal se mantuvo por lo menos hasta las 72 hs post infección. El tamaño de la banda principal de *mRNA* específico que se detectó migra cercano a la banda de 1.4 kb del marcador de peso molecular de RNA. Este resultado es coherente con el tamaño mínimo aproximado del *mRNA* predicho que incluye el ORF de *EGT* y la señal de poliadenilación.

También se observó la presencia de bandas secundarias de mayor peso molecular (la más importante de aproximadamente de 3.6 kb), que comienzan a aparecer débilmente a partir de las 24 hs y se hacen más visibles a las 40 hs post infección para luego, decaer abruptamente. Durante una caracterización *in vitro* del gen *egt* de AcMNPV, O'Reilly y Miller (1990a) detectaron dos transcritos de 1.8 Kb y 3.0 Kb que fueron informados como dos transcritos 5' co-terminales tempranos que incluían otros ORFs ubicados *downstream* (O'Reilly y Miller, 1990b). Estos resultados, fueron coincidentes con los nuestros y también fueron descritos por otros autores (Smith y Goodale, 1998; Caradoc-Davies *et al.*, 2001) aunque hasta el momento este tema no ha sido analizado en detalle.

Rapid amplification of cDNA ends - RACE

El ensayo RACE fue planificado con el fin de determinar precisamente los extremos no codificantes del gen *egt*, definir su promotor y su INR. De ésta manera se completó la información teórica (que ya fue comentada previamente) sobre las secuencias *upstream* y *downstream* del gen *egt*. En el ensayo se determinaron los extremos 5' y 3' del *mRNA* del gen *egt*. Para ello, se utilizó el *mRNA* total seleccionado especialmente a partir de los datos obtenidos en el ensayo de expresión a diferentes tiempos post infección.

5' RACE

Debido a que el experimento de cinética de la expresión del gen *egt* mostraba la presencia de un transcripto principal y uno secundario [con menor nivel de expresión y de aparición muy limitada en tiempo] se optó por realizar el ensayo de 5'RACE seleccionando *mRNA* correspondiente a dos tiempos post-infección. El *mRNA* obtenido a 24 hs .p.i y 48 hs .p.i fue tratado como se ha descrito en los M&M.

Como resultado de la amplificación con los *primers* “outer” y siguiente re-amplificación con los *primers* “inner”, se encontró como resultado final, que a ambos tiempos *post-infección* se un producto principal de amplificación de unos 180 pb (Figura III. 19),

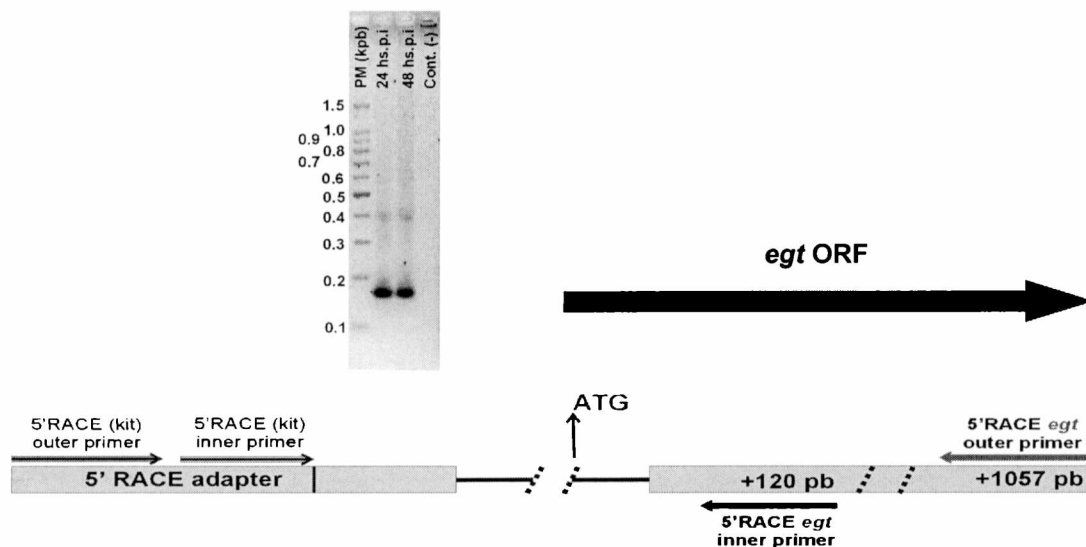


Figura III. 19: 5'RACE: Esquema de la posición de los *primers* *inner* y *outer* [específicos para *egt* y del *kit* RLM-RACE]. En la foto se muestra el resultado de la amplificación obtenida con los *primers* “inner” correspondientes, realizado sobre muestras de RNA total extraído a las 24 y 48 hs post infección [gel agarosa 2.5 % / BrEt]. No se incluye la totalidad de secuencia entre los primers (---)

Este fragmento de DNA fue clonado en pZErO-2 y los clones recombinantes se seleccionaron por análisis de las colonias con *primers* universales. Para la determinación precisa del extremo 5'RACE, se purificaron 10 de estos clones recombinantes y luego se secuenciaron. El resultado de estos secuenciamentos se observa en la figura III. 20:

5'-CGCGCTGCGTTTGCTGGCTTTGATGAAA-**ATCAGT**CATC**ATG**TGGACAGCGATCGTAGTTGTTTTGGCC
AGCAGCGCCGCGCGCACAAATA--- CCCGCATATAGTCACA**ACTCGGTTTTCAACGCGTACATGG**--- 3'-*egt*

Figura III. 20: Resultado del secuenciamiento de los insertos que fueron amplificados y luego clonados (fig. 19). La secuencia de los *primers* que se utilizaron se ha subrayado y parte de la secuencia específica del extremo 5' del gen *egt*. En amarillo y negrita se marca el codón de iniciación (**ATG**) y en sombreado más claro se marca la región INR extendida [ATCAGTCA] que contiene al sitio INR temprano **CAGT** y en negrita la **A** del sitio exacto de inicio de la transcripción. La marca --- indica fracción de continuidad de secuencia que no se detalla por razones de espacio.

El resultado fue muy claro y coincidente con la predicción basada en el análisis teórico de la secuencia. Previamente y por análisis teórico se había encontrado como motivo INR más probable, a una region “INR extendida” que comenzaba en -10 *upstream* del ATG y

que además incluía un clásico motivo de promotor temprano CAGT en -8, este INR está ubicado además a unas 30 pb *downstream* de la secuencia del TATA box (Fig. III. 10). Con este resultado se pudo definir exactamente donde comenzaba el mRNA de *egt*-EpapGV. De acuerdo a la bibliografía consultada, normalmente los transcritos de *egt* tienen sus sitios de inicio de transcripción ubicados en la zona -25 a -30 con respecto al ATG (detectados por otros métodos) y se encuentran entre los 20 y 30 nucleótidos *downstream* del TATA box. *egt*-EpapGV es entonces el primer gen de GV's que se reporta con un inicio de transcripción tan cercano al ATG.

Con el ensayo de *extensión de primer*, que fue planificado previamente al experimento de RACE, se pensó en detectar también el inicio de transcripción del mRNA específico para *egt*. Aunque en un caso se obtuvo un resultado similar al de RACE, este no fue repetitivo. Este es el experimento que se realiza normalmente para determinar el extremo 5', aunque en este caso no funcionó de manera clara y por ello se debió utilizar la técnica de RACE.

3' RACE

Para la determinación del 3' RACE, también se siguió el protocolo descrito en M&M. La estrategia que se sigue es similar a la del 5' RACE con la excepción de que el 3' *adapter* posee una cola de 12 T y dos nucleótidos de anclaje que permiten levantar los mRNAs poliadenilados (Fig. III. 21).

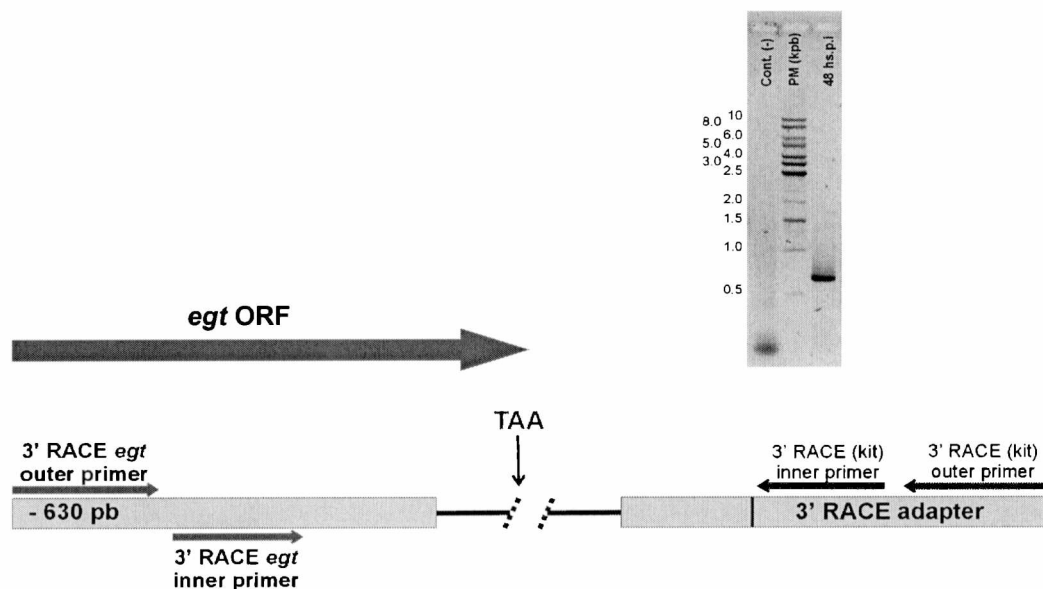


Figura III. 21: 3'RACE: Esquema de la posición de los *primers* *inners* y *outers* [específicos para *egt* y del kit RLM-RACE]. En la foto se muestra el resultado de la amplificación obtenida con los *primers* *inners* correspondientes, realizado sobre muestras de RNA total extraído a las 48 hs post infección.

Los datos obtenidos del secuenciamiento de los clones recombinantes del 3' RACE demostraron que la poliadenilación del mRNA específico de *egt* ocurre 17 nucleótidos

downstream de la senial de poliadenilación en el nucleótido +1356 [Citosina] y que esta señal de poliadeanilación se superpone parcialmente con el codon de terminación (TAA) del ORF de *egt*.

Esto demuestra que como ocurre con otros transcriptos de *egts* de baculovirus, el transcripto de *egt* de EpapGV es poliadenilado.

egt-5'--//--//--AATGCATCTACGATCTCCCACTAAGGATGTGAGCT--//--//-- CCAATTTGTGTTGAGAAATAAAATATTTTGT
ACTACCATAAA**TAAATAAA**CGATAAAAA**C**AAAAAAAAAAAAACCTATAGTGAGTCGTATTAATTCGGATCCGCG-3'

Figura III. 22: Resultado del secuenciamiento de los insertos 3' RACE que fueron amplificados y luego clonados (fig. 21). Subrayados se indica la secuencia de los primers que se utilizaron y parte de la secuencia específica del extremo 3' del gen *egt*. En amarillo y negrita se marca el codón de *stop* (TAA) y en sombreado mas claro se marca el sitio de poliadenilación AATAAA y en negrita la C que marca el sitio exacto de inicio de la cola de poliA. No se incluye la totalidad de secuencia entre los primers (--//--)

En resumen, se ha identificado y realizado la caracterización biológica y molecular detallada del gen *egt*. El mismo posee 1338 pb y codifica para una proteína de 446 aminoácidos. Se determinó que la enzima EGT tiene 53% de identidad y 76% de similitud con la más relacionada de las EGT (la del virus de la granulovirus de *Lacanobia oleracea*, LoGV). Por la determinación de extremos utilizando RACE, se confirmó que la expresión del gen *egt* se encuentra bajo el control de un promotor temprano (CAGT) ubicado a sólo ocho pares de bases *upstream* del ATG, siendo este el primer promotor de genes temprano de GVs que se ubica en una posición tan cercana al ATG. Asimismo se comprobó que el mRNA específico es poliadenilado.

Se realizó la expresión del *egt* en dos sistemas diferentes que permitieron concluir que el gen es funcional, que codifica para la enzima EGT (ecdisona glicosil transferasa) y que el peso molecular aparente de la proteína es 52.5 kDa.

Se demostró también que el gen es activo *in vivo* mientras se produce el proceso infeccioso, y que las larvas no infectadas también modifican a la ecdisona por algún proceso de conjugación similar a la glicosilación. El patrón de conjugación observado en larvas no infectadas es completamente diferente al observado en larvas infectadas con EpapGV y parecería acompañar la evolución de la muda de la larva.

CAPÍTULO IV

**Desarrollo de un método de tipificación
genómico para el control
de calidad de la producción de EpapGV
basado en la técnica de PCR**

Capítulo IV

Desarrollo de un método de tipificación genómica para el Control de Calidad de la producción de EpapGV basado en la técnica de PCR

Introducción

La aplicación de EpapGV en el control biológico de una de las plagas más importante de la soja exige el montaje de una metodología de producción masiva de virus. En cada una de las etapas debe controlarse distintos aspectos de calidad; uno de ellos es la identidad del virus con el cual se está trabajando. Para ello se desarrolló un método de tipificación del genoma basado en la técnica de PCR.

El objetivo primario fue desarrollar un método de control de calidad para realizar el seguimiento de la producción del DNA viral que luego se utilizaría en el proceso de formulación del bioinsecticida en base a *Epinotia aporema* granulovirus (EpapGV). Por otra parte, el método podría aprovecharse en otro tipo de aplicaciones. La técnica debía de satisfacer ciertos requisitos que permitieran incluirla fácilmente dentro de un programa de control o certificación de la calidad del proceso de formulación (especificidad, reproducibilidad, sensibilidad, bajo costo relativo y tecnología accesible).

Los métodos inmunológicos basados en el uso de un antisuero contra granulina (o poliedrina) solo son apropiados para la detección y cuantificación de una infección por baculovirus. Esto se debe a que las proteínas principales de los cuerpos de oclusión (granulina en GVs y poliedrina para los NPVs) exhiben alto grado de conservación en sus secuencias. Para el caso de granulina, el grado de identidad en la secuencia aminoacídica de la proteína es 75.7% y el de homología es 89.5% para todos los GVs secuenciados hasta el momento (Parola *et al.*, 2002). En función de ello, los determinantes antigénicos principales o mayoritarios de estos virus provocan reacciones cruzadas, con lo cual esta técnica no permite realizar identificación viral y es inapropiada para ser utilizada en sistemas de control de calidad de la formulación viral.

Por el contrario, la identidad viral se podría definir con mayor precisión utilizando técnicas que apuntan al análisis del genoma, como por ejemplo patrones de restricción del DNA viral. Si bien este análisis aporta perfiles específicos para cada aislamiento viral, requiere partir de una gran cantidad de cuerpos de oclusión y efectuar el aislamiento de DNA altamente purificado. En este sentido los formulados virales, son mezclas complejas de diversos ingredientes, lo cual dificulta la purificación del virus. Como desventaja, esta alternativa molecular representa un alto costo operativo y cierto grado de complejidad, que deben ser tomados en cuenta al pensar en ensayos de control de calidad.

Por ello, se decidió desarrollar un método basado en la técnica de PCR. De esta manera se podrían realizar estudios de rutina sobre una pequeña cantidad de muestra, en forma rápida y con un costo relativamente bajo.

Al comienzo de este trabajo, se habían descrito experimentos que contemplaban el uso de la técnica de PCR para la detección y caracterización genotípica de baculovirus en insectos (Moraes y Maruniak, 1997; Faktor y Raviv, 1996; Burand *et al.*, 1992). A partir del año 1997, comenzó a extenderse la aplicación de esta metodología para realizar estudios de diferente tipo, tales como la detección de baculovirus en muestras de diferente origen (suelo, agua, detritus, etc.), la combinación de esta técnica con otras para lograr la identificación y diferenciación entre NPVs (Moraes *et al.*, 1999; Lupiani *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; England *et al.*, 2001; Christian *et al.*, 2001) y el seguimiento de la replicación de baculovirus en células de insecto (Rosinski *et al.*, 2002).

Si bien el uso de la técnica se ha extendido en los últimos años, no existen informes sobre su aprovechamiento como una herramienta eficiente para realizar el control de calidad de la producción de un bioinsecticida viral formulado.

Aquí se describirá cómo se aprovechó la limitada información de secuencia del DNA de EpapGV para implementar un ensayo de caracterización y tipificación del genoma de EpapGV.

Al iniciar estos estudios, se contaba con información parcial sobre las secuencias de los genes *egt* y *granulina* de EpapGV equivalente a menos del 1.0 % de la información genómica que posee el virus. Con la idea de aumentar la cantidad de información de secuencia disponible (sin realizar el secuenciamiento completo del genoma viral) y que esa información proviniera de cubrir gran parte del genoma viral, se determinó secuencia de los extremos de los fragmentos de DNA genómico clonado y seleccionados de las diferentes bibliotecas de EpapGV. De esta manera, la información obtenida alcanzó a cubrir un 8.4 % de la información genómica viral.

La metodología desarrollada, resultó ser altamente específica y reproducible para realizar no sólo el control de calidad de la producción de bioinsecticida sino que también puede ser aplicable a otros estudios tales como la detección de infecciones latentes con EpapGV, transmisión vertical del virus, distribución y persistencia del virus en el ámbito de la naturaleza. Esta técnica puede aplicarse también como metodología de tipificación genómica en casos en los que la información de secuencias nucleotídicas es escasa.

Materiales y métodos

IV.1) Obtención del virus EpapGV

Las larvas de *E. aporema* se obtuvieron a partir de la colonia que fuera originalmente establecida en el IMYZA-INTA (Castelar). Brevemente, las larvas se mantuvieron sobre dieta artificial a 25 ± 1 °C, con ciclos luz-oscuridad de 14:10 hs y un ambiente de 60% de humedad relativa (Green *et al.*, 1976). La amplificación viral fue llevada a cabo alimentando larvas de *E. aporema* de cuarto estadio con dieta artificial (libre de formalina) contaminada con 4.000 cuerpos de oclusión (OBs) por mm^2 . Después de un periodo de incubación de cinco días (a 25 ± 1 °C), las larvas fueron colectadas y homogeneizadas en agua destilada. Luego fueron filtradas a través de un filtro de algodón. Los gránulos fueron purificados mediante dos ciclos de centrifugación en gradiente continuo de sacarosa 30-60% (w/w) a 100000 g durante 60 minutos a 4°C. Las bandas que contenían los OBs fueron aisladas del gradiente, diluidas 1:4 en agua destilada y luego centrifugadas a 8,000 g durante 60 minutos a 4°C. Los OBs purificados fueron resuspendidos en agua destilada y conservados a - 20°C. Los viriones fueron liberados por la disolución de los gránulos en un medio alcalino de Na_2CO_3 0,1 M (pH 10,5) a 37°C durante 30 min. Esta suspensión fue neutralizada por adición de un volumen de Tris-HCl 100 mM (pH 6,5), los OBs no disueltos fueron separados por centrifugación a baja velocidad y el sobrenadante fue utilizado para aislar el DNA viral.

IV.2) Purificación del DNA

Los OBs de EpapGV que se utilizaron para el desarrollo de estos experimentos tuvieron tres orígenes diferentes: a) gránulos purificados por gradiente de sacarosa, b) homogeneizado de larvas infectadas y c) formulado viral (bioinsecticida). Las muestras de DNAs se obtuvieron de diferente manera según el origen de los OBs de EpapGV. Muestras a) después de la resuspensión de los gránulos como se describió en 2.1, los viriones fueron tratados con proteinasa K (a concentración final de 0,25 mg/ml) por 1 h a 37 °C. Esta solución fue extraída luego con fenol-cloroformo, cloroformo-isoamílico y, finalmente, el DNA fue precipitado con un volumen de isopropanol (Sambrook *et al* 1989). Muestras b) las larvas infectadas fueron homogeneizadas en agua destilada, filtradas y el producto se centrifugó a 14000 rpm en microcentrífuga. El sedimento se resuspendió en 200 μl Na_2CO_3 0,1 M (pH 10,5), se incubó a 37°C durante 30 minutos y se centrifugó a 14000 rpm durante unos segundos para eliminar los OBs no disueltos y restos celulares. La suspensión se trató luego con 300 μl de solución GES (tiocianato de guanidinio 5M, EDTA 100 mM, sarcosyl 0.5%, pH 7,5), esta suspensión fue extraída luego con 500 μl de fenol-cloroformo-isoamílico y finalmente precipitada con alcohol 100%. Muestras c) se



Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

57010

tomó 0.1 g del polvo seco de bioinsecticida, se resuspendió en 300 µl de agua destilada y luego se filtró mediante filtro de algodón, luego la muestra se procesó exactamente como se describió en el paso anterior.

La muestra de DNA que se utilizó como control negativo se obtuvo a partir de larvas de *E. aporema* no infectadas. Las mismas fueron tratadas como se describió en el caso b. El DNA precipitado con etanol fue disuelto en agua destilada estéril y conservado a -20°C.

En estos ensayos también se utilizaron los DNAs heterólogos de CpGV y AgMNPV con el fin de verificar la especificidad de los patrones obtenidos con DNA de EpapGV.

IV.3) Diseño de *primers*

Los *primers* fueron diseñados sobre la base de información de la secuencia disponible, (aproximadamente un 8.4 % del total del genoma de EpapGV). Las mismas correspondían a secuencias de extremos de clones genómicos de diferentes bibliotecas (Manzán *et al.*, 2002). Sobre la base de esta información de secuencia correspondiente a los clones A, D, E, F, G, H e I, de la genoteca EpapGV - EcoRI, se diseñaron 28 *primers*. A estos *primers* se agregaron los correspondientes a los genes de *egt* y *granulina*. El conjunto de todos los *primers* utilizados en este experimento se distribuye a lo largo de un 60% del genoma de EpapGV.

Todos los *primers* utilizados en este ensayo fueron diseñados de la misma manera. Cada fragmento de secuencia, que se obtuvo por secuenciamiento manual ó automático, fue examinado en detalle con el fin de detectar regiones de alta entropía informativa, de esta manera se generó una lista de los *primers* para cada secuencia que fue clasificada según valores de entropía (Ghiringhelli; Aljinovic *et al.*, 1999 *resultados no publicados*). Las bases teóricas para el diseño de *primers*, de máxima especificidad y mínima probabilidad de hibridación al azar, fueron obtenidas a partir de la “teoría de la información”. Brevemente, se definió el tamaño de los *primers* a diseñar, la secuencia fue “*scaneada*” considerando este tamaño, luego para cada posible *primer* se realizó una segunda selección considerando tres parámetros fundamentales: contenido de GC, complejidad de la información (estimación de la temperatura de desnaturalización (*melting*)). y penalidad según la información contenida en el extremo 3' de cada primer. La temperatura de *melting* fue estimada utilizando una regla sencilla (Suggs *et al.*, 1981):

$$T_m = (2^{\circ}\text{C} \times X) + (4^{\circ}\text{C} \times Y) - 4^{\circ}\text{C}. \quad X = \text{A ó T} \quad Y = \text{G ó C}$$

La selección final de los *primers* se realizó tomando pares correspondientes a secuencias adyacentes, que permitieran generar por PCR fragmentos de un tamaño apropiado. De

Cada par de *primers* diseñado fue inicialmente probado en PCRs individuales para confirmar el tamaño de amplificación. Luego, los 16 pares obtenidos se dividieron en 3 grupos que formarían las diferentes mezclas de *primers* a ser utilizadas en los ensayos de *multiplex* PCR. Ambos ensayos de PCR fueron realizados utilizando moldes de DNA de *EpapGV* que tenían diferente procedencia (OBs purificados y formulado viral).

La PCR fue realizada utilizando un termociclador de aire para tubos capilares, Air Thermocycler (*Idaho Technologies Inc.*). Cada uno de los pares de *primers* diseñados fue inicialmente probado en PCRs individuales para asegurar que el producto de amplificación

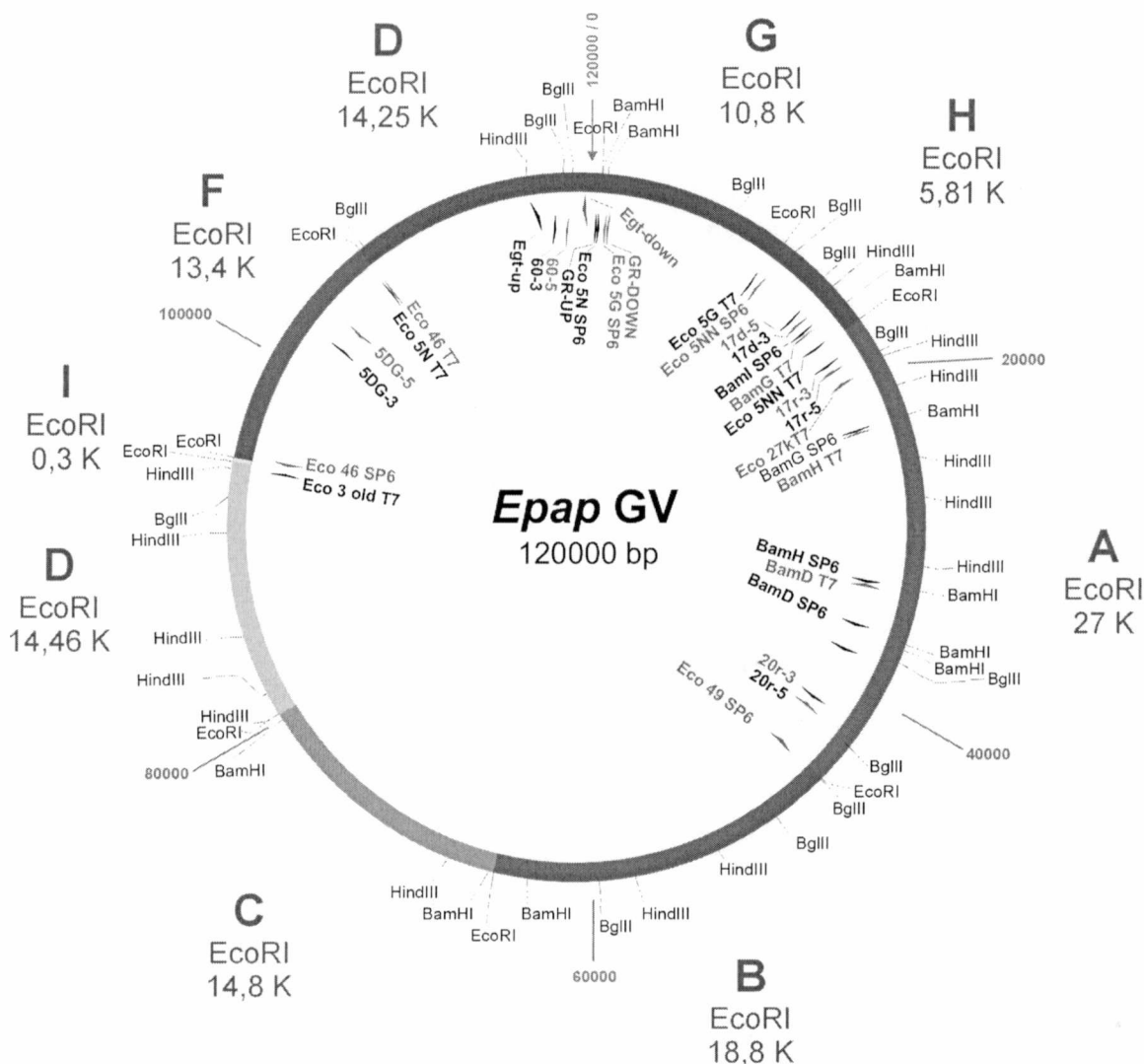


Figura IV.1: Mapa físico de EpapGV: en el grafico se muestra la posición relativa de los *primers* diseñados sobre la información de secuencia de extremos de las bibliotecas de DNA de *EpapGV* (Manzán *et al.*, 2002; Parola *et al.*, 2002).

fuera específico y que tuviera el tamaño esperado. Los *sets* de *primers* denominados A, B y C, se utilizaron para realizar las múltiplex PCR sobre DNA extraído de OBs purificados y de OBs provenientes de formulado bioinsecticida viral. Todas las reacciones de PCR se realizaron utilizando *Taq* DNA polimerasa en las condiciones estándar recomendadas por el fabricante.

Para las PCRs individuales, la mezcla de reacción empleada fue la siguiente: 1 X buffer, cada *primer* 0,5 μ M, cada dNTP 0,2 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, 5 ng de DNA molde y 0,25 unidades de *Taq* DNA polimerasa, en un volumen de reacción de 10 μ l. El programa de ciclado utilizado fue el siguiente:

Desnaturalización	94 °C	2 min	
<hr/>			
Desnaturalización	92 °C	10 segundos	
Hibridación	50 °C	10 segundos	35 ciclos
Extension	72 °C	1 minuto	
<hr/>			
Extension final	72 °C	3 minutos	

Para las *multiplex* PCRs, se ajustaron las concentraciones de *primers*, dNTPs, $MgCl_2$ y molde, con el objeto de optimizar los patrones de amplificación. La mezcla de reacción contenía: 1 X buffer; 2 μ M de los pares de *primer* 1, 6, 8 y 9; 1 μ M de los pares de *primer* 3 y 5, y 0.5 μ M de los pares 2, 4, 7 y 10 (los números de los pares de *primer* se indican en la Tabla 1); 0.4 mM de cada dNTP; 2.25 mM $MgCl_2$; 25-50 ng de DNA molde y 0.25 unidades de *Taq* DNA pol, en un volumen de reacción de 20 μ l. El programa de ciclado que se aplicó a las *multiplex* PCRs fue el mismo que se describió para las PCRs individuales.

IV.5) Determinación de la sensibilidad del ensayo de PCR

La sensibilidad del ensayo de PCR fue determinada en experimentos sucesivos e independientes. La cámara de Neubauer se utilizó para cuantificar la concentración de OBs de EpapGV presentes en muestras purificadas.

La concentración inicial de la que se partió fue de $6,4 \times 10^{10}$ OBs / ml. A partir de esta cantidad de OBs se realizaron diluciones seriadas al medio hasta llegar a 8×10^7 OBs / ml, sobre estas diluciones se realizó la extracción del DNA como se ha descrito previamente.

Se determinó la cantidad de DNA extraído y considerándose el rendimiento del proceso de extracción, se estimó nuevamente la cantidad de OBs que correspondía a cada alícuota de DNA,.

Para los ensayos de PCR se partió de una cantidad de DNA equivalente a $1,1 \times 10^8$ OBs hasta llegar mediante diluciones seriadas a la cantidad de DNA equivalente a los 300 OBs (aproximadamente 40 fg de DNA).

Para realizar el ensayo, se seleccionaron los pares de *primers* número 3 y número 16 de la Tabla 1 (como representantes de amplificación de fragmentos de pequeño y gran tamaño).

IV.6) Análisis de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 2.5 % (w/v) teñida con 1 g/ml de bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular de DNA, se utilizó un marcador comercial de múltiplos de 100 pb.

Resultados y Discusión

IV.1. PCRs individuales

Sobre la base de la información parcial de secuencias genómicas de EpaGV se diseñaron oligonucleótidos con el fin de obtener por PCR, una serie de productos de amplificación característica, que permitieran realizar el seguimiento de la identidad e integridad genómica de EpaGV durante el proceso de formulación del bioinsecticida.

Para ello se probaron en PCRs individuales cada uno de los pares de *primers* diseñados (Tabla 1).

Mix	Calle en gel [@]	Nombre del <i>primer</i>	Secuencia del <i>primer</i>	Tamaño estimado (pb)
A	1	20r-5	TCCGTGTCCAACCTGAAACCGT	146
		20r-3	AACAACCGAGGATCTGTTGAT	
	2	Eco 46 T7	GTGTTGCACCAACCGTG	210
		Eco 5N T7	CGTTAGGTTGGACACGT	
	3	60-5	GGTAGATTGTACACCACCCTG	335
		60-3	CTCCCACTAAGGATGTGAGCT	
	4	Bam D T7	CGGCAAAGAACACGTTG	439
		Bam H SP6	TCCGACGGTGTATCGCT	
	5	Eco 5G T7	CCAGTCTGACATAGCGT	615
		Eco 5NN SP6	GTCGTGCGAGTAAGCGT	
	6	Eco 5N SP6	TCGGTGCTCAACGATGT	750
		GR-down	CGCTTGACTCAGTAGAT	
B	7	17d-5	TCTTCGAACTCACGCAGAG	178
		17d-3	CCTCTGAACTTATAAGGGT	
	8	Bam G SP6	GACACCGATCGTGTGGT	270
		Bam H T7	GGTCGCGGAAATCGTAC	
	9	Eco 5NN T7	CTACGAACCTAGGCGTG	330
		Eco27K T7	TGATATTATGATCGTCAC	
	10	Eco 5G SP6	AGAGCGTACTGCATCGT	354
		Eco 5N SP6	TCGGTGCTCAACGATGT	
C	11	GR-up	TTACAACAGCGACGTGT	830
		GR-down	CGCTTGACTCAGTAGAT	
	12	17r-5	TTGTGGATGGTACAGCCCCAG	206
		17r-3	CACGCGGCCGGATCAGTATAT	
	13	Bam I SP6	TCTACAAGCAGCAGCCG	308
		Bam G T7	ACGGAATCGAACCCTG	
	14	5DG-5	GGTCACGTTCTGTCACAGACT	474
		5DG-3	GACCTTCTGACGCACGGATT	
	15	Eco 3 old T7	AGGTCCGCGCTGTAGAT	880
		Eco 46 SP6	CCACAGCTTGATTGTG	
	16	Egt-up	GGGTACCAGATTGGACATTATATCAC	1450
		Egt-down	GGAATTCCGCTCCAACATCAGTCATC	

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados como *primers* en el estudio de PCRs múltiples e individuales. Los números de la segunda columna identifican los pares de *primers* y calles de siembra de las electroforesis mostradas a continuación. Las letras A, B y C de la primera columna agrupan a los oligonucleótidos incluidos en cada mezcla de *primers* (mix) utilizada para las *multiplex* PCRs. [@] Los números de esta columna coinciden con los indicados en las calles de los geles de agarosa de las figuras 2, 3, 4 y 5, en los que se analizan por electroforesis los productos de amplificación con cada uno de los pares de *primers*.

El ensayo fue realizado utilizando como molde el DNA extraído de OBs de EpaGV, con diferente grado de pureza. Los pasos de purificación diferían para cada tipo de muestra y fueron descritos en la sección M&M. Se comprobó que el resultado de las PCRs

individuales era el mismo independientemente del tipo de muestra procesada para aislar el DNA viral. Usando como molde tanto DNA proveniente de OBs purificados como de larvas infectadas o de formulado viral, el patrón de amplificación que se obtenía para cada par de oligonucleótidos era siempre como el que se observa en la Figura IV.2.

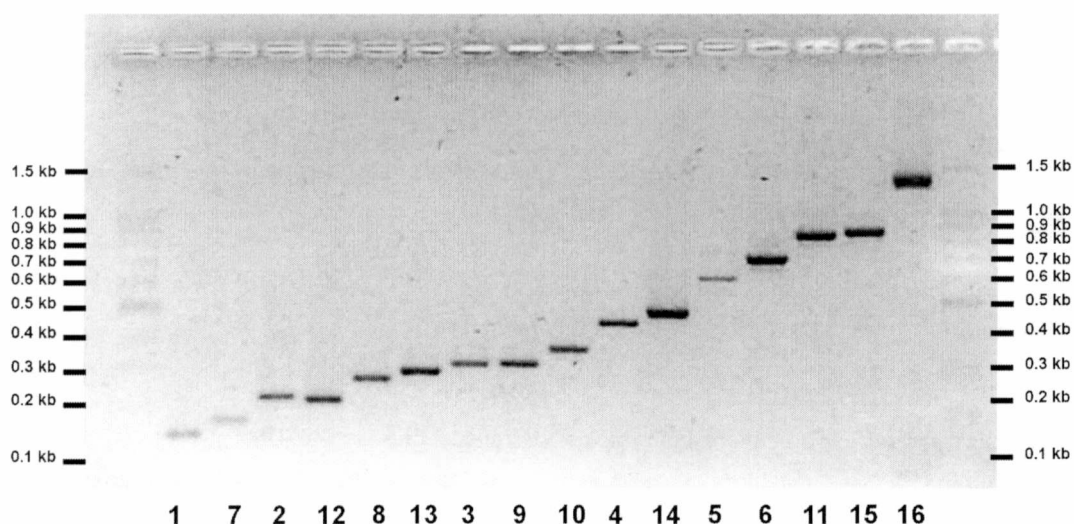


Figura IV. 2: Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de los productos la PCR realizada con los pares de *primers* individuales descritos en la **Tabla 1** y utilizando como molde DNA de *EpapGV* proveniente de OBs purificados por gradiente de sacarosa. El mismo resultado se obtuvo para PCRs individuales a partir de DNA de *EpapGV* provenientes de homogenado de larvas de *E. aporema* infectadas y de formulado viral (bioinsecticida). A ambos lados de la fotografía se indican los marcadores de peso molecular de 100 pb. Los números de calle corresponden a los descritos en la **Tabla 1**, segunda columna.

Con este ensayo se demostró que, independientemente del origen del DNA viral, los fragmentos de amplificación obtenidos coincidían con los estimados teóricamente. Asimismo, no se observaron patrones ambiguos aún en presencia de DNA heterólogo [DNA de larva *E. aporema*].

En la Figura IV.3, se muestra uno de los controles de amplificación que consistió amplificar por PCRs el DNA extraído de larvas de *E. aporema* no infectadas utilizando los pares de *primers* individuales.

En este caso la mayoría de los pares no dio señal de amplificación específica. Sólo cinco pares de *primers* de los dieciséis pares que fueron probados, dieron amplificación. Los productos que se observaron fueron menores a 100 pb. Tres de los pares (1, 6 y 14) dieron como resultado bandas de amplificación de tamaño discreto, pero que no coincidían con los estimados teóricamente para amplificaciones específicas sobre DNA de *EpapGV*.

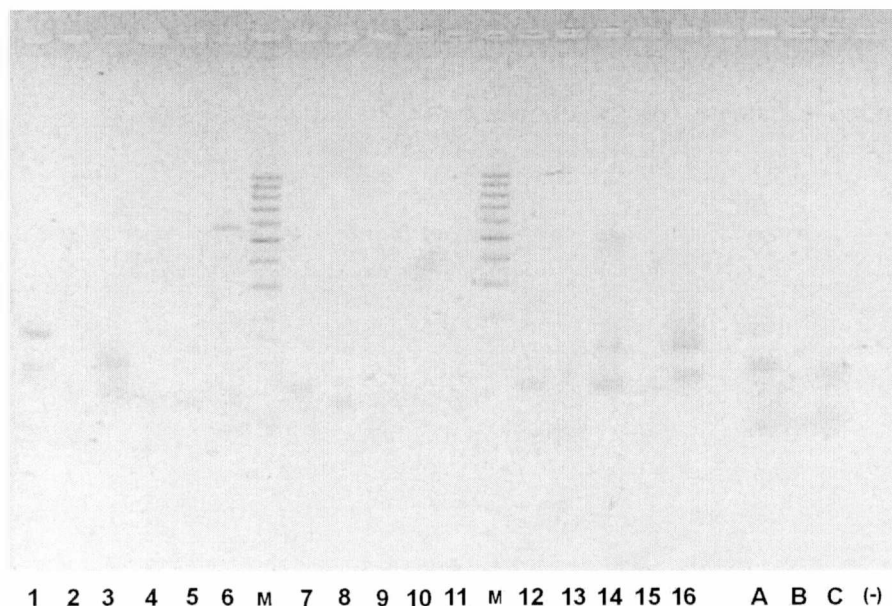


Figura IV.3: PCR realizada con *primers* individuales utilizando como molde DNA de larvas de *Epinotia aporema* no infectada. A, B y C muestran el resultado de la *multiplex* PCR realizada sobre el mismo molde. (-) es el control negativo de la reacción de PCR. Las muestras se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa 2.5%. **M:** marcador de tamaños de 100 pb de origen comercial.

IV.2. *Multiplex* PCRs

Con el fin de simplificar el ensayo de caracterización del DNA viral se agruparon los *primers* individuales para realizar *multiplex* PCRs. Para ello se formaron tres grupos de *primers* descritos en la Tabla 1 (primera columna: Mix). La idea original fue obtener un patrón tipo *fingerprint* para cada una de las mezclas de *primers*, que permitiera definir en una sola PCR la identidad viral. De esta manera se lograría reducir la complejidad del análisis de un gran número de muestras.

En el proceso de optimización de la *multiplex* PCR se probaron concentraciones variables de *primers*, Mg^{++} , DNA, dNTPs y Taq polimerasa. Se determinó una composición de reactivos que resultó ser la mejor combinación para realizar la *multiplex* PCR sobre DNA de OBs purificados. En ensayos paralelos se realizaron las PCRs individuales [en el orden que conformaban cada mezcla de *primers*] y las *multiplex* PCRs. Los moldes utilizados fueron DNA proveniente de los OBs purificados y DNA extraído directamente del formulado bioinsecticida viral. En la Figura IV.4 se muestra el resultado del ensayo de *multiplex* PCR realizado sobre DNA extraído de OBs purificados.

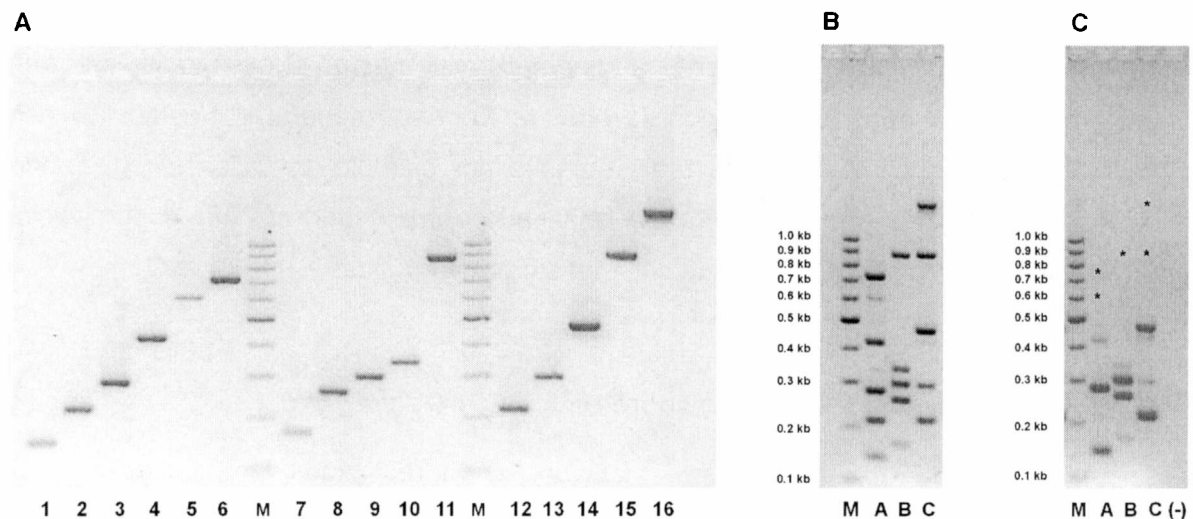


Figura IV.4: Multiplex PCR. En A: Resultado de las PCRs individuales realizadas con cada par integrante de la mix A [par 1 a 6], mix B [par se muestra 7 a 11] y mix C [par 12 a 16]. En B: Resultado de la *multiplex* PCR realizada con la mix de *primers* llamadas mix A, mix B y mix C utilizando como molde DNA de *EpapGV* proveniente de OBs purificados y en C: Resultado de la *multiplex* PCR realizada con la mix de *primers* llamadas mix A, mix B y mix C utilizando como molde DNA de *EpapGV* proveniente de OBs del bioinsecticida formulado. Los * indican las bandas de mayor peso molecular que están ausentes en las *multiplex* PCRs. Las muestras se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa 2.5% [BrEt] a 80 volts/hora. M: marcador de tamaños de 100 pb de origen comercial.

Los resultados de las amplificaciones individuales, sobre ambos moldes, dieron patrones únicos y repetitivos. A su vez, los resultados mostraron que las *multiplex* PCRs realizadas sobre DNA de *EpapGV* proveniente de OBs purificados produjeron patrones de bandas coincidente con el predicho en las PCRs individuales (Figura IV.4B).

A su vez, el ensayo de *multiplex* PCR realizado sobre DNA de *EpapGV* extraído directamente de OBs del bioinsecticida formulado, generó un patrón de amplificación que era levemente diferente al obtenido en el caso anterior (Figura IV.4C). Si bien se observó la mayoría de las bandas de amplificación que se esperaban, se notaron diferencias en las intensidades relativas y la ausencia de las bandas de mayor peso molecular. Este ensayo fue repetido en diferentes ocasiones sobre este tipo de muestras pero con diferentes grados de purificación [usando métodos rápidos de purificación que se puedan aplicar al nivel de laboratorios de campo] y siempre se obtuvo el mismo resultado.

Estos resultados indican que el conjunto de las PCRs individuales puede ser utilizado para obtener en forma reproducible un patrón de bandas definido que es característico del genoma de *EpapGV* a partir de muestras de DNA obtenidas con diferentes métodos de purificación.

Por otra parte, si bien es altamente específico, el ensayo de *multiplex* PCR realizado sobre DNA de bioinsecticida formulado no produjo un patrón completo de bandas de amplificación. Se estima que la falta de amplificación de las bandas de mayor peso molecular podría deberse a la presencia de determinadas sustancias de la formulación,

que no se eliminarían totalmente con métodos groseros de purificación. Si bien esto no parece afectar significativamente las reacciones de PCR individuales, se observa inhibición de la amplificación de determinados *amplicones* cuando el ensayo se realiza en presencia de mayor número de juegos de *primers*. De esta manera, el traslado de esta metodología a nivel campo debería rediseñarse a por ejemplo, la utilización de menor número de *primers* que integran cada *mix* ensayada ó intentando realizar la purificación del DNA viral mediante la utilización de columnas cromatográficas.

IV.3. PCRs individuales y *multiplex* sobre DNA de CpGV y AgMNPV.

Los ensayos de PCRs individuales y *multiplex* fueron realizados también sobre DNA proveniente de otros virus integrantes de la familia *Baculoviridae*. El objetivo de este experimento fue determinar la especificidad de amplificación de los *primers* que se estaban utilizando. Para esto se partió de DNA de CpGV [un granulovirus filogenéticamente muy cercano a EpapGV] y DNA de AgMNPV como representante del género de los *Nucleopolyhedrovirus* (Figura IV.5)

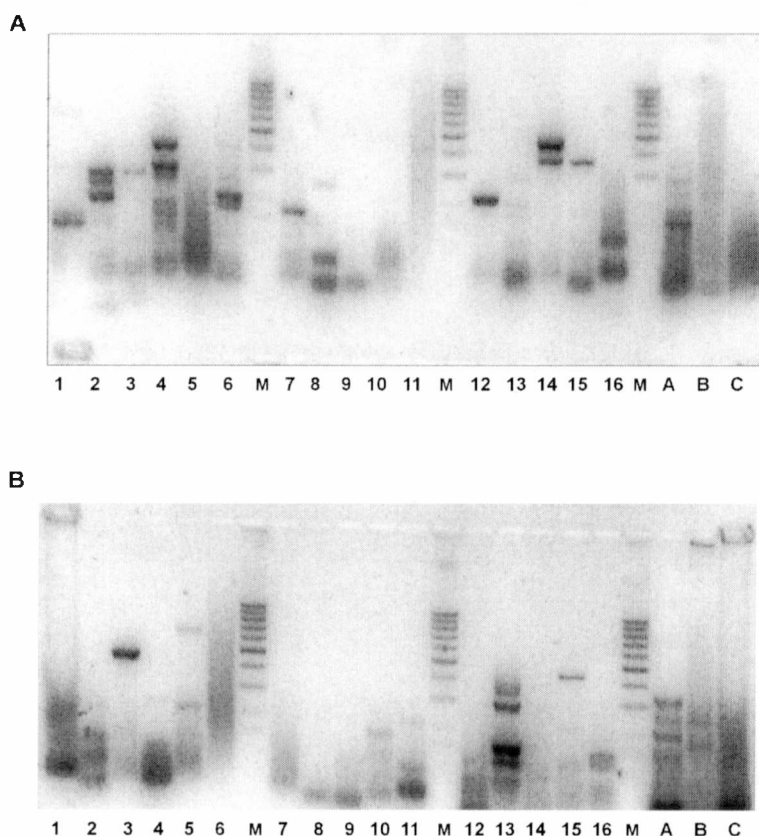


Figura IV.5: Amplificación por PCRs usando los primers de Tabla 1 sobre DNA de otros baculovirus. A: PCRs individuales y *multiplex* usando como molde DNA obtenido de gránulos purificados de CpGV. **B:** PCRs individuales y *multiplex* usando como molde DNA obtenido de poliedros de AgMNPV. Los carriles A, B y C en cada gel muestran el resultado de las *multiplex* PCRs cuando se utilizan los juegos de *primers* A-B-C [Tabla 1] sobre cada uno de los moldes. Las muestras se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa 2.5%. **M:** marcador de tamaños de 100 pb de origen comercial.

En este caso ninguno, de los dos diferentes tipos de DNA utilizados como molde en las

multiplex PCRs, generó un patrón de bandas característico como el obtenido con DNA de EpapGV. Asimismo en los ensayos de PCRs individuales las bandas de amplificación que se detectaron no coincidían con las bandas de amplificación que se obtenían utilizando como molde el DNA de EpapGV. Estos resultados, ponen en evidencia el grado de especificidad del método desarrollado.

Estos últimos resultados permiten confirmar que además de poder realizar el seguimiento de la producción del formulado viral en base a *EpapGV* de la manera en que se ha detallado, se podrían detectar otros DNAs baculovirales que eventualmente aparecieran como contaminantes en el proceso de formulación ya que aparecerían perfiles de PCR diferentes al obtenido con *EpapGV*.

IV.4. Sensibilidad del ensayo de PCR

La sensibilidad del ensayo de PCR fue determinada en experimentos sucesivos. Como primer paso, se utilizó la cámara de Neubauer para determinar la concentración de OBs de *EpapGV*.

La concentración inicial de la que se partió para realizar los ensayos de sensibilidad fue de $6,4 \times 10^{10}$ OBs / ml. En un primer experimento se ensayaron reacciones de PCR sobre $1 \mu\text{l}$ de DNA extraído a partir de diluciones de OBs que abarcaban un rango de $1,1 \times 10^8$ OBs hasta llegar a tener $3,1 \times 10^6$ OBs (Figura IV.6).

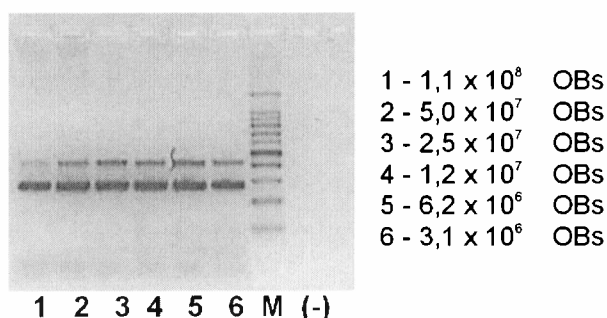


Figura IV.6: Determinación de sensibilidad de la PCR: PCRs realizadas con dos juegos de *primers* utilizando como molde DNA obtenido de OBs purificados de *EpapGV*. Las PCRs se realizaron sobre $1 \mu\text{l}$ del DNA, equivalente a la cantidad de OBs que se detallan a la derecha de la foto. Las muestras se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa 2.5%. **M:** marcador de tamaño de 100 pb de origen comercial.

Sobre la base del resultado de la PCR anterior se determinó el rango de diluciones a evaluar para determinar el intervalo de sensibilidad. Para ello, a partir del DNA correspondiente a $6,2 \times 10^6$ OBs, se realizaron PCRs sucesivas utilizando dos *primers*, sobre diluciones seriadas que comprendían el rango 1:20 hasta 1:200000 (equivalente esta última a 31 OBs), Figura IV.7.

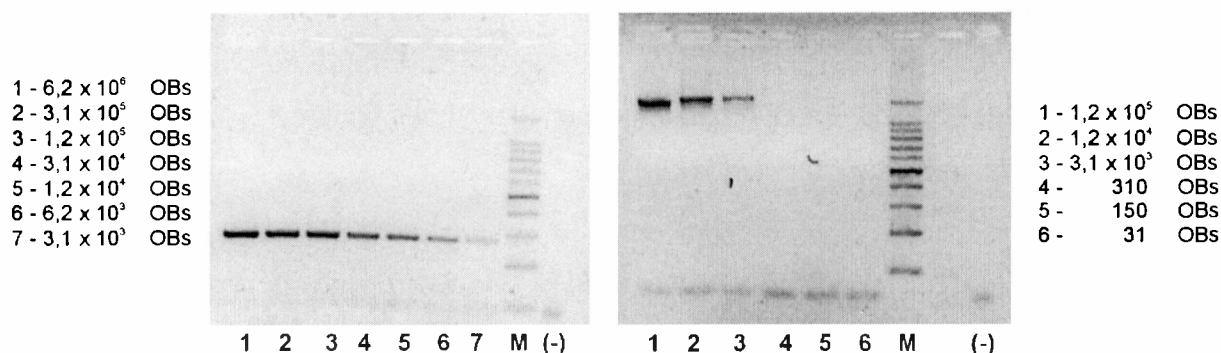


Figura IV.7: Ajuste de Sensibilidad de la PCR: PCRs realizadas con los pares de *primers* número 3 y 16 [Tabla 1]. Las PCRs se realizaron sobre las 1 μ l del DNA obtenido de las diluciones de OBs detalladas a izquierda y derecha de cada foto. Las muestras se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa 2.5%. **M:** marcador de tamaños de 100 pb de origen comercial.

Con los dos últimos ensayos se determinó que el límite de sensibilidad se encontraba entre los 3100 OBs y 310 OBs. En ensayos que no se muestran aquí, se determinó que la mínima cantidad de OBs que se puede detectar con el ensayo es aproximadamente 416 OBs equivalentes a 55 fg de DNA. Si bien para los NPVs se han informado límites de detección, medidos en número de OBs, menores al que se obtuvo en este ensayo, se debe tener en cuenta que cada OB de un granulovirus contiene una sola copia del genoma viral, a diferencia de lo que ocurre con los NPVs en los cuales existe más de una copia de genoma por OB. En este sentido, el límite de sensibilidad del método desarrollado se encuentra en el orden de los datos publicados por otros autores [Moraes *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; England *et al.*, 2001].

En resumen, se ha logrado optimizar un ensayo de PCRs individuales que genera un patrón de identificación de *EpapGV* específico y reproducible, independiente del grado de pureza del DNA de *EpapGV* que se utilice, que permitirá realizar el seguimiento de cada etapa del proceso de formulación del bioinsecticida.

Se ha implementado un ensayo de *multiplex* PCR muy conveniente para realizar control de calidad sobre un gran número de muestras de DNAs purificados. Sin embargo, los resultados demostraron también que en el ensayo de *multiplex* PCR hay parámetros que son críticos [concentración relativa de *primers*, de dNTPs, de Mg^{++} y pureza del DNA] y que afectan de manera importante la eficiencia de la amplificación. Estos factores limita su aplicación a la tipificación de DNA extraído de OBs purificados.

Este tipo de ensayo puede ser acoplado con otro tipo de herramientas de detección como por ejemplo, bioensayos, hibridación *in situ*, técnicas inmunológicas, etc. es decir puede ser utilizada con otros fines no relacionados estrictamente con el control de calidad de la formulación.

La metodología de extracción descrita aquí, es simple, con pocos pasos y tiene la ventaja

de requerir un tiempo de procesamiento de la muestra hasta obtener el resultado que es relativamente corto comparado con otros métodos. Además, para la implementación de la técnica no se requiere de laboratorios de alta complejidad.

El hecho de disponer de juegos de *primers* que se distribuyen a lo largo de casi un 60 % del genoma de EpapGV, permite usar esta técnica para obtener indicadores de integridad del genoma viral. Sobre esta base, la metodología podría utilizarse para realizar el seguimiento de los baculovirus silvestres o modificados genéticamente que se liberan a la naturaleza.

El estudio demuestra que disponiendo de información de menos del 10% de la secuencia del genoma viral se puede desarrollar un ensayo de identificación o tipificación altamente específico. Los resultados sugieren que este tipo de ensayo podría aplicarse a un gran número de baculovirus para los que se dispone de información limitada a las secuencias terminales de los fragmentos de restricción de su DNA genómico.

CAPÍTULO V

Clonado y Análisis molecular del gen de la Helicasa de EpapGV

Capítulo V: Clonado y análisis molecular del gen de la *helicasa* de EpapGV

INTRODUCCION

Muchos de los baculovirus son de particular interés debido a su alto potencial como agentes de control biológico de plagas, caracterizándose por tener alta especificidad y ausencia de toxicidad para especies distintas a la plaga blanco (Murhammer, 1996). Pero es justamente el hecho de ser altamente específicos lo que los posiciona con cierta desventaja frente a otros productos de control biológico capaces de controlar más de una especie de Lepidópteros. En este sentido, en los últimos años se han comenzado a estudiar los factores virales que determinan la especificidad del huésped.

En los últimos años se demostró la importancia que tendrían otros genes virales en la especificidad de huésped, aquí se incluyen varios genes *inhibidores de apoptosis* (*iap*, la muerte celular programada es un mecanismo de defensa que bloquearía la dispersión de virus), la DNA-polimerasa, el producto del gen *hrf-1* y la *DNA-helicasa* (Griffits *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1998; Croizier *et al.*, 1994).

Específicamente para DNA helicasa de los NPVs, se han realizado estudios que implicaron la cotransfección de células Sf21 con los DNAs de BmNPV y AcMNPV, donde se obtuvieron variantes de AcMNPV con inserciones de porciones del DNA de BmNPV, capaces de replicarse en células BmN. Normalmente, AcMNPV no es capaz de replicarse en *Bombyx mori* ni en células BmN o Bm5 (Argaud *et al.*, 1998; Kondo y Maeda, 1991; Mori *et al.*, 1992) y BmNPV no se replica en células Sf21 más que a un nivel residual (Martin y Croizier, 1997). En estudios sucesivos se pudo atribuir la expansión del rango de huéspedes a la sustitución en el genoma de AcMNPV de la secuencia correspondiente a los aminoácidos 413-602 de la **DNA helicasa (p143)** por la región homóloga de BmNPV. Más específicamente se demostró que el cambio fenotípico estaba localizado entre los aminoácidos 550 a 576 (Maeda *et al.*, 1993; Croizier *et al.*, 1994), siendo el cambio de uno (Kamita y Maeda, 1997) o dos aminoácidos (Argaud *et al.*, 1998) los responsables de la expansión del espectro de huéspedes. El mecanismo molecular no es del todo claro, pero se ha demostrado que la Helicasa de AcMNPV ejercería un efecto tóxico para las células BmN, bloqueando la síntesis de proteínas (Kamita y Maeda, 1993), aunque el efecto no es tan marcado con cepas de AcMNPV diferentes a las utilizadas en estos estudios. Estudios adicionales realizados seleccionando los recombinantes de AcMNPV capaces de replicar en larvas de *B. mori* han definido que los aminoácidos en posición 564 y 577 de la DNA helicasa son los responsables de matar a este insecto (Argaud *et al.*, 1998). Por lo tanto, el reemplazo de estos residuos de aminoácidos en la Helicasa de AcMNPV amplía su espectro de huéspedes a *B. mori*.

Para la mayoría de los NPVs se ha informado la presencia de una única helicasa (Helicasa I). Solo para LdMNPV se ha informado la existencia de dos genes que codifican para Helicasa I y Helicasa II.

En el caso del grupo de GV's, la información es limitada y está restringida solo a describir la presencia del gen de *helicasa I* en TniGV, PxGV, XcGV, CpGV y PhopGV. Para estos últimos cuatro GV's se ha informado la presencia de dos, los genes de *helicasa I* y *II*.

Recién en el año 2000, Bideshi y Federici ampliaron la información en relación a *helicasa I* y su papel en la especificidad de rango de huésped. Estos autores comprobaron que aunque AcMNPV y TniGV poseen Helicasa I que difieren bastante en su composición aminoacídica, ambos virus son capaces de infectar de *T. ni*. Sorprendentemente observaron que la sustitución del gen de *helicasa I* (p143) de AcMNPV con el gen de *helicasa I* (p137) de T.niGV, no permitía la replicación de AcMNPV tanto sobre células como sobre larvas de *T.ni*. (Bideshi y Federici, 2000).

Estos últimos resultados estarían en contradicción con la hipótesis planteada en los estudios sobre NPVs sobre la relación entre las Helicasas y la especificidad de rango de huésped. Para profundizar los estudios sobre el rol de la Helicasa decidimos identificar y caracterizar Helicasa/s en EpapGV.

Nota

Los resultados que se presentan en este capítulo se han obtenido en colaboración con la Bioquímica Adriana García.

Materiales y Métodos

La metodología general empleada en la detección de los genes de *helicasa*, fue muy similar a la descrita en el Capítulo III. Aquí se describirán solamente las particularidades que correspondieron al clonado, secuenciamiento, análisis de secuencia y cinética de expresión de los genes *helicasa I* y *helicasa II*.

V. 1) Ubicación de los genes de *helicasa*

El análisis de los datos de secuencia obtenidos a partir del secuenciamiento de extremos de clones de las diferentes genotecas permitió la ubicación de genes (Parola *et al.*, 2002), que por comparación de estos datos con los recientemente publicados sobre la secuencia del genoma de CpGV (Luque *et al.*, 2001), permitió identificar la posición de los genes de *helicasa I* y *helicasa II* de EpapGV.

Para el gen de *helicasa I* se seleccionó el fragmento *EcoR I*-C (14.8 kb) de la genoteca *EcoR I*. Este fragmento fue secuenciado desde sus extremos y se realizó una caminata genómica utilizando secuenciamiento automático. Los *primers* utilizados para realizar la caminata fueron diseñados sobre la base de la secuencia que se obtenía en cada paso (*CRC-Chicago Sequencing Center*). Para el secuenciamiento completo de *helicasa I* se realizaron cinco caminatas. Para el gen de *helicasa II* se seleccionó el fragmento *EcoR I*-E (14.25 kb) y sobre el mismo se realizaron cuatro caminatas.

Con la secuencia completa de los fragmentos correspondientes se realizó el mapeo exacto de los mismos. Esto permitió seleccionar los sub-fragmentos de cada clón que luego serían utilizados en los análisis de expresión de los genes de *helicasa I* y *II*.

V. 2) Análisis de homología de las secuencias de los genes de *helicasa*s

Las secuencias de DNA obtenidas fueron analizadas con el programa DNASIS (Hitachi). Los análisis comparativos y las búsquedas en base de datos fueron llevadas a cabo usando los programas provistos por el servidor de internet NCBI-Blast (blast n y blast p) junto al paquete de programas del GCG Gap (GCG, Madison, Wisconsin). Los ORFs de *helicasa*s y las secuencias de *Helicasa*s, de los bancos de datos de NCBI, fueron comparados utilizando el programa Clustal X (Cap. III – M&M).

V. 3) Análisis filogenético

El análisis filogenético fue llevado a cabo usando también los programas Clustal X con el fin de generar múltiples alineamientos (Thompson *et al.*, 1974, 1994). Se obtuvo un árbol filogenético (sin raíz) derivado del método del *neighbor joining* (Saitu y Nei, 1987) con 1000 réplicas de *bootstrap*. El árbol fue generado con el paquete de programas que componen a PHYLIP (SEQBOOT, DNAPARS, PROTPARS y CONSENSE) versión 3.5, (Felsenstein *et al.*, 1996). Los números de acceso de las secuencias usadas en la generación de estos

árboles filogenéticos fueron obtenidos de los bancos de datos y compilados en la Tabla 1 del Cap. III – M&M.

V. 4) Análisis transcripcional de los genes de *helicasa*

Para realizar este análisis se utilizó la técnica de RACE (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds). En principio, para determinar en qué momento era conveniente tomar la muestra de RNA para realizar el experimento de RACE, se determinó la cinética de expresión de los genes de *helicasa*. Se realizó un ensayo de *northern blot* sobre RNA total (de larvas infectadas y no infectadas, ver Cap. III-M&M), extraído a 24, 36, 48, 56 y 72 hs post infección. En este experimento se utilizaron sondas específicas para cada uno de los genes (ver V. 1); para *helicasa I*, se usó como sonda un fragmento de la región media del gen. Para *helicasa II*, se usó el fragmento completo del gen.

V. 4-1) Marcación de las sondas de DNA y *Northern-blot*

Las sondas homólogas fueron marcadas por el método de *random priming* (Sambrook *et al.*, 1989) utilizando un *kit* no radiactivo (*AlkPhos Direct System, Amersham-Pharmacia*), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los experimentos de hibridación fueron llevados a cabo utilizando condiciones estrictas para ambas sondas homóloga. La temperatura de pre-hibridación e hibridación fue de 55 °C para las dos *helicasa*s. Luego de la hibridación durante 12 hs, se realizaron dos lavados sucesivos con soluciones de lavado provistas en el *kit*, a la temperatura de 50 °C y un último lavado a temperatura ambiente.

La detección final se llevó a cabo utilizando un reactivo quimioluminiscente provisto en el *kit* (*CDP-star*). Para ello, la membrana se puso en contacto con el reactivo y dos minutos después se expuso a una placa autorradiográfica específica. Las placas se revelaron a las dos y cuatro horas post exposición.

V. 4-2) RACE

El RACE es una técnica rápida para lograr la amplificación de extremos de cDNA usando PCR. Esta técnica permite conocer el tamaño y la secuencia exacta de cada extremo no codificante de un RNA. Para llevar a cabo estos experimentos se utilizó el *kit* RLM-RACE (Ambion) como se ha descrito en Cap. III.

Para el gen de *helicasa I*, se diseñaron los *primers ad hoc* para la determinación del extremo 3' del mRNA específico. La secuencia de los *primers inner* y *outer* se detalla debajo:

3' *helicasa I*.outer: 3'-GAGGTTAAAGACAGCGCCACCGTT-5'.

3' *helicasa I*.inner: 3'-TGCTTGAAAACGATGCCACCTACA- 5'.

Para el gen de *helicasa II* se diseñaron los *primers* utilizados en la determinación de ambos extremos (5' RACE y 3' RACE). La secuencia de los mismos se detalla debajo:

3' *helicasa II*.outer: 3'- GCGAACACGACGGTCGCTCGAT-5'

3' *helicasa II*.inner: 3'-AATCAGGGTATGACTGTGAT- 5'

5' *helicasa II*.outer: 5'-GTTGCATATACACATATGGCAGCGAG- 3'

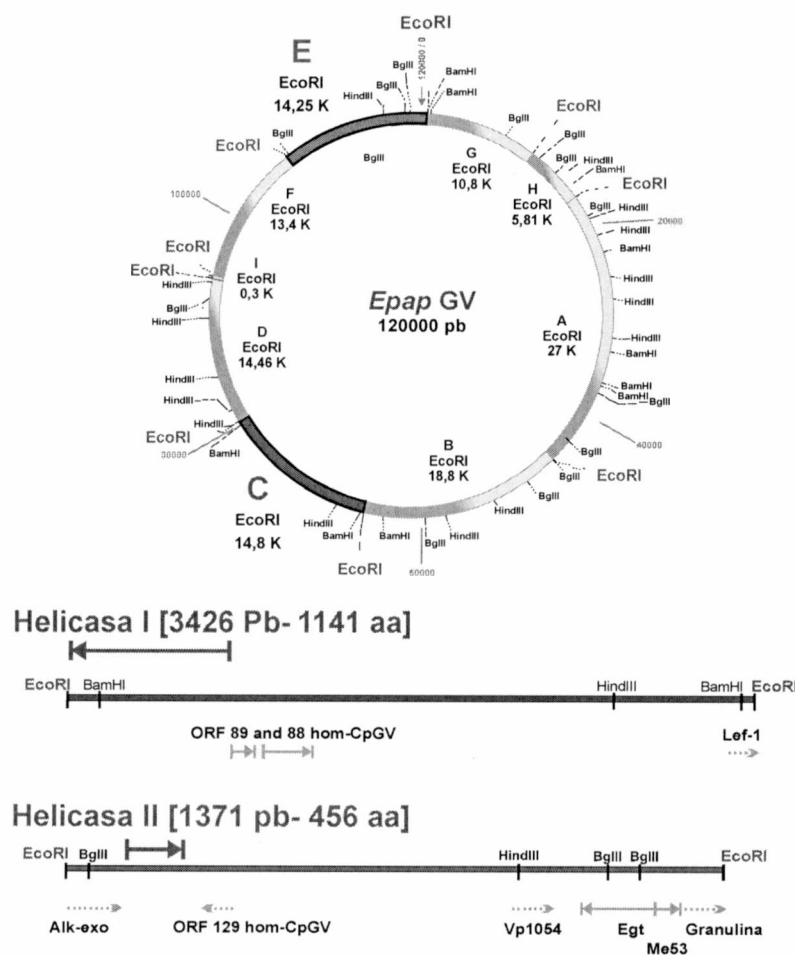
5' *helicasa II*.inner: 5'-TTGATTATGTGGTGTCTAGACA-3'

Los productos de amplificación obtenidos para los respectivos extremos de *helicasa I* y *helicasa II*, se clonaron en el vector pZErOTM-2 en el sitio de inserción EcoR V. Se secuenciaron al menos 5 de los clones que dieron la amplificación del tamaño previsto y luego se analizaron las secuencias. Las secuencias se realizaron por duplicado con *primers* universales (Sp6 y T7) y específicos.

Resultados y Discusión

V. 1) Localización de los genes *helicasa I* y *helicasa II* de EpapGV

El resultado obtenido del secuenciamiento de extremos de los clones de las genotecas permitió localizar la posición de ciertos ORFs en el DNA de EpapGV (Parola *et al.*, 2002). Si bien se ha informado que EpapGV y CpGV (granulovirus filogenéticamente muy cercano a EpapGV) presentan grandes regiones del genoma en posición invertida, la zona que se analizó para iniciar la búsqueda de genes de *helicasa* (al menos en ordenamiento de genes) era muy similar en ambos virus. Esto permitió que por comparación de la posición de los ORFs *odv-e25* y *vp39* se pudiera ubicar la posición aproximada del gen de *helicasa I*. El mismo se encontró en uno de los extremos del clon *EcoR* I-C (14.8 kb) de la genoteca *EcoR* I de EpapGV (Figura V.1). Para el gen de *helicasa II*, se determinó que el mismo se encuentra también cerca de uno de los extremos del clon *EcoR* I-E (14.25 kb) de la genoteca *EcoR* I de EpapGV (Figura V.1).



Ref: Complete ORF
 Incomplete ORF (parcialmente secuenciados o que continúan en otro fragmento de la genoteca)

Figura V.1: Ubicación y posición relativa de los genes *helicasa I* y *helicasa II* de EpapGV. En el mapa de restricción de EpapGV se muestra la ubicación relativa de los genes *helicasa I* y *II*. Abajo: El ORF de *helicasa I*, se encuentra en el fragmento *EcoR*-C (14.8 kb) y el

ORF de *helicasa II*, se encuentra en el fragmento *EcoRI*-E (14.25 kb). En la figura se muestran también los ORFs flanqueantes a cada uno de los genes de *helicasa*s.

V.2) Secuencia y comparación de los genes de *helicasa I* y *II*

El secuenciamiento de extremos de los clones mencionados permitió el diseño de *primers* específicos que facilitaron el acceso a la información de la secuencia genómica completa de la zona del fragmento *EcoRI* I- C que contenía a *helicasa I*. A partir de los datos de secuencia se ubicaron los ORFs flanqueantes al mismo y un preciso mapeo de los genes encontrados. Los correspondientes ORFs encontrados fueron homólogos a los ORF 88, 89 y 91 de CpGV (*helicasa I* de CpGV es el ORF 90) (Figura V.1). Se determinó que el ORF completo de *helicasa I* comprende a 3426 pb y que codifica para la proteína Helicasa I de 1141 aminoácidos. El análisis comparativo de las secuencias Helicasas I del GenBank para *Granulovirus*, mostró un promedio de 34% de identidad y 73% de homología con CpGV y PhopGV.

Asimismo, para el gen de *helicasa II*, se determinó la secuencia completa y la ubicación de los ORFs flanqueantes al mismo. Los correspondientes ORFs encontrados fueron homólogos a los ORF 127 (*alk-exo*) y ORF 129 de CpGV, siendo el ORF 128 la *helicasa II* de CpGV (Figura V.1). El ORF completo del gen *helicasa II* tiene 1371 pb y codifica para una Helicasa II de 456 aminoácidos. La comparación de las secuencias de las Helicasas II del GenBank demostró que esta proteína posee un 55% de identidad y un 71% de homología con las respectivas Helicasas II de XcGV y PxGV. Cabe mencionar que solo existe información de la presencia de Helicasa II en cuatro granulovirus y un NPV (LdMNPV).

En este Capítulo, solo se mostrarán las regiones de secuencia *upstream* y *downstream* para ambos genes de *helicasa*.

V. 3) Cinética de transcripción del mRNA específico de los genes *helicasa I* y *II*

Para determinar el comienzo de la transcripción y la temporalidad de expresión de los genes de *helicasa I* y *helicasa II*, se planificaron experimentos de cinética de expresión y RACE (Figura V.2).

Se determinó que Helicasa I presenta la aparición de un transcripto principal de aproximadamente 3.6 kb a las 36 hs post infección. El tamaño de este transcripto es acorde al tamaño esperado por análisis teórico de la secuencia. También se observó un segundo transcripto de aproximadamente 4.6 kb a las 56 hs post infección (Fig. V.2). La intensidad de ambos transcriptos va aumentando a partir de las 24 hs post infección. Estos resultados son coincidentes con otros ya publicados (Bideshi *et al.*, 1998).

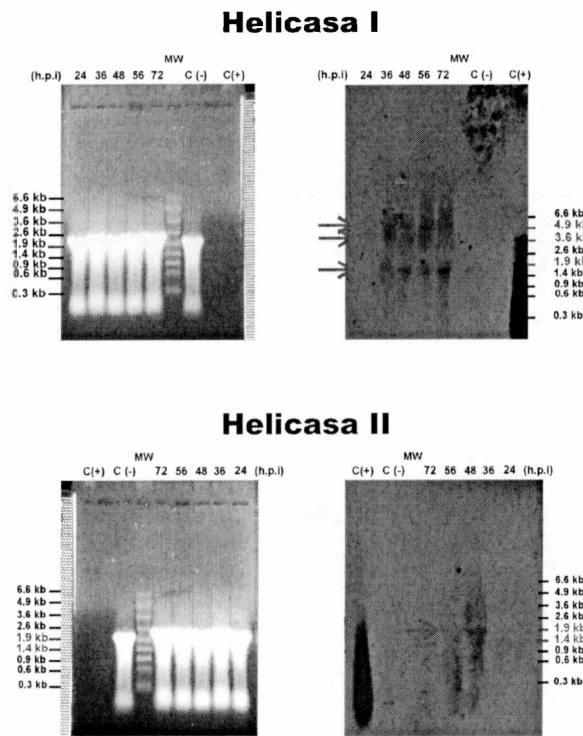


Figura V.2: Cinética de expresión de los genes de *helicasa I* y *II*. Northern blot realizado sobre RNA total extraído de larvas infectadas y sin infectar. A la izquierda se muestran los respectivos geles de agarosa desnaturalizante 0.7 % teñido con BrEt. A la derecha los resultados del Northern-blot. Las sondas utilizadas, demostraron la presencia de dos transcritos posibles para helicasa I. Uno principal de ~3.6 kb y otro secundario de 4.9 kb. Para helicasa II, se observa la presencia de un transcrito de aproximadamente 1.7 kb que solo aparece a las 48 hs post infección. Los transcritos se indican con flechas rojas.

En la cinética de expresión del gen de *helicasa II*, se determinó que el mismo presenta un transcrito principal de aproximadamente 1.7 kb que aparece solo a las 48 hs post infección (Fig. V.2). El tamaño de este transcrito se correspondió con el tamaño esperado por análisis teórico de la secuencia.

La expresión del gen de *helicasa I* ocurrió al inicio del proceso infeccioso y se mantiene al menos hasta las 72 hs post infección, mientras que para *helicasa II* la cinética de expresión no se daría a lo largo de todo el proceso infeccioso. Esto sugiere que la Helicasa II se produciría en un momento determinado del proceso y para cumplir un determinado papel en el ciclo de infección.

V. 4) Determinación de los extremos RACE de los genes de *helicasa I* y *II*

El ensayo RACE fue planificado con el fin de determinar precisamente los extremos no codificantes de los genes de helicasa I y II, definir su promotor y su INR. De ésta manera se completó el análisis teórico realizado sobre las secuencias *upstream* y *downstream* de ambos genes. En el ensayo se determinaron los extremos 5' y 3' del *mRNA* del gen *helicasa II* y el extremo 3' del *mRNA* del gen de *helicasa I*. Aún resta determinar el extremo 5' del *mRNA* de este gen.

Para ello, se utilizó el *mRNA* total seleccionado especialmente a partir de los datos obtenidos en el ensayo de expresión a diferentes tiempos post infección. De esta manera para realizar los ensayos de RACE, se partió de RNA extraído a las 48 hs post infección.

El resultado obtenido del análisis de la región *upstream* y *downstream* de *helicasa I* se muestran en la Figura V.3:



Figura V.3: Análisis de la secuencia upstream del gen de helicasa I y determinación del extremo 3' del mRNA de Helicasa I. En A, se muestra (parcialmente) la secuencia del gen de *helicasa I* y la región upstream al ATG. Los recuadros muestran los posibles sitios INR y TATA box. En B, se muestra la secuencia del gen *helicasa I* (parcialmente), los primers *outer* e *inner* específicos, el codon de stop TAA, la señal de poliadenilación y el sitio exacto de terminación del mRNA específico (todos en cuadros de diferentes colores). La fotografía muestra los productos de amplificación utilizando los primers *outer* e *inner* específicos de *helicasa I*, obtenidos a partir de RNA 48 hs post infección. El producto de la PCR obtenido con los primers *inner* fue clonado y secuenciado para corroborar la especificidad del fragmento clonado.

Para el gen de *helicasa I*, se realizó un análisis teórico de la secuencia nucleotídica *upstream* del gen, y se encontraron al menos un posible sitio iniciador de la transcripción en el nucleótido 105 *upstream* del ATG, asimismo se detectaron los posibles TATA boxes en las regiones 100, 200 y 300 nucleótidos *upstream* del ATG de *helicasa I* (Figura V.3.A).

El análisis del extremo 3' del mRNA específico de *helicasa I*, mostró que el transcripto es poliadenilado y que la región 3' no traducida comienza 17 nucleótidos *downstream* del codon

de stop TAA. La señal de poliadenilación AATAAA coincide en parte con el codon de stop TAA (Figura V.3.B).

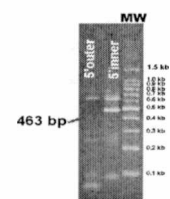
Para Helicasa II, se determinaron ambos extremos del *mRNA* específico utilizando la técnica de RACE. En la Figura V.4 se muestra el resultado de ambos experimentos:

A

```

-288 TATATAAATGAAGGTATAGGATTGAAATTTACTCAATTGAGCAACTATTGCGCGAACAAGCTACCGCTCTAGCTAAATCCAAATTTTATGG
-192 GAGGTACTGATTTAGCTGATATATTGTTGCGTCAACCGGATGTACACGGACCGCACTGTATATGAAAGATCCGATGAAGAAACCGTACCTGG
-96 ACATCAATATGACGCAACCGGCAACCGGCAAGCAACTCAAACTGACGATGAGACGATTTTGAACGAGATTCCCGTASATTCATGAGGAGGAT
0 GAATTGGTGGGATGCGTTCGCTTAACTAAGAAACGATGCAACCGGAGAGAACTGTGAGAGATTATCCGACACCTTAAACATATGAGGAA
M E S V P L T R T I E P E E T V E S I A E H L K Q Y D E K
+96 AGTTTAAACAGGGTCTGTTTAAACGTTTAACTAAATCAAGATCAACAAAAGTGTGATATGTTGGTGTCTAGACAAGAACTTGGAGATAT
+29 F N T R L V K P V T L N Q S Q Q K L F D Y V V S R Q E F E P I F
+192 TTGGTCTGGTAGCGCTGGTACGCAAAAAGTGGTGTGTTGGTGTGCAAAAACGCTGGAAGATGATAAAAAATTGTGATGACGGTGCAT
+61 V S G S A G T G K S A L L L A L Q K R W E D D K K I V M T V A Y
+216 ATACACATATGGCAGCGAGAACG
+93 T H M A A R N V

```



B

```

+1153 GGAGGTTGGTCCGTTGATCAAAACGCGAACACGCGGTGCGTGGATGTGGTTGACCAAGCGACGTCATGTTTCTACTGATGACAAGCAGTATGT
+341 E V G P L I K R E H D G R S M W L T K A T V M F S T D D K Q Y V
+1249 TAAATGATAACCGGACTGCGTATGCGTTATGGATGGGGGGCAGGTTTCACAAAGATCAGGCTATGATTAATTGATGTAATCCTGAT
+373 K M I T G L P M R Y G W G G T V H K N Q G M T V I N L I V N P D
+1345 AAGGTGTTTGTAAATGGACAAGCATATGTTGCGCTGAGTAGAGTAACCTATTGACGCGGACTCAAACCTGATTAGTCCCATCCGAAACGCCATATT
+405 K V F V N G Q A Y V A L S R V T H C S G L K L I S P I P E R H I
+1441 AGTGTCAATGATGATTGATCAAAAATATATGAGTCTATGAACAAGTTGGTTGTGCGATGAAAAAATTATAAATCGATTTTTACTAAAAATTCCTT
+437 S V M N D V T K I Y E S M N K L V V E *

```

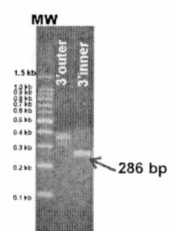


Figura V.4: Análisis y determinación de extremos 5'y 3' del mRNA de Helicasa II. En A, se muestra (parcialmente) la secuencia de la zona 5' del gen de *helicasa II* y la región *upstream* al ATG. Los recuadros muestran los sitios INR y TATA box definidos por el experimento de 5'RACE. También se muestra la secuencia de los *primers outer* e *inner* específicos de *helicasa II*, marcadas en cuadros, que se utilizaron en la determinación del extremo. En B, se muestra la secuencia del gen *helicasa II* (parcialmente) de la zona 3' del gen, los *primers outer* e *inner* específicos, el *codon de stop* TAA, la señal de poliadenilación y el sitio exacto de terminación del mRNA específico (todos en cuadros de diferentes colores). Las fotografías en A y B, muestran los productos de amplificación de cada uno de los extremos del mRNA de *helicasa II*, obtenidos a partir de RNAs 48 hs post infección. Los productos de la PCR obtenidos para el extremo 5' y el extremo 3' fueron clonados y secuenciados para corroborar la especificidad de los fragmentos clonados.

El análisis de los resultados obtenidos en los ensayos de RACE para *helicasa II* demostraron que la misma posee un sitio iniciador de la transcripción (INR) TACT ubicado a 263 nucleótidos *upstream* del ATG, el cual no es un INR convencional. Según Blissard y col. (1996) en algunos genes de baculovirus existen motivos no convencionales para promotores e iniciadores, que serían dependientes de la expresión de otros factores virales durante el curso de la infección. El secuenciamiento del fragmento amplificado en el ensayo de 5' RACE, determinó que el INR se encuentra flanqueado por la secuencia CAATT y permitió ubicar el TATA box a -288 del ATG (Figura V.4.A y B).

El secuenciamiento del extremo 3' RACE permitió definir que el mRNA específico de *helicasa II* es poliadenilado y que la región de transcripto específico termina a 23 nucleótidos

downstream del codon de *stop* TAA. Se encontró una señal típica de poliadenilación AATAAA ubicada a + 11 nucleótidos del TAA.

V. 5) Análisis filogenético de los genes de *helicasa I* y *II*

El análisis filogenético utilizando las secuencias aminoacídicas de las Helicasas I y II, permitió la construcción de los siguientes árboles (Figura V. 5)

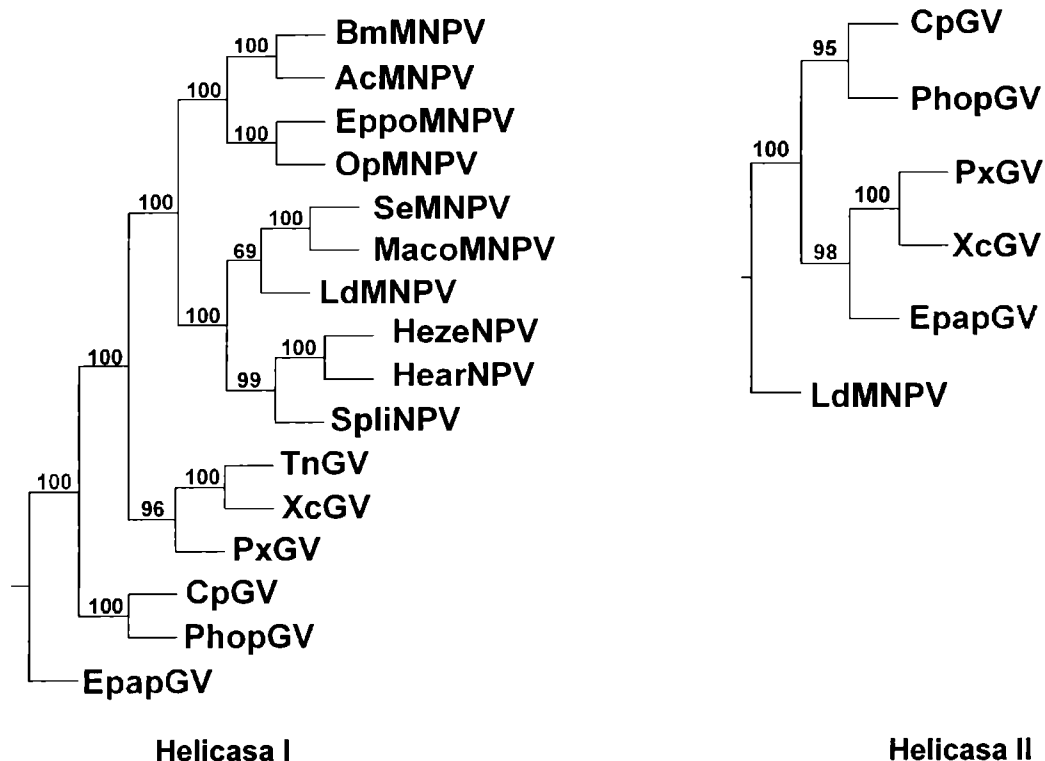


Figura V.5) Árboles filogenéticos, basados en la secuencia aminoacídicas de Helicasas I y Helicasas II. Los mismos fueron obtenidos usando los programas del paquete *Phylip* aplicado al alineamiento múltiple obtenido a partir de *Clustal X* para cada una de las Helicasas. La consistencia de cada nodo es indicadora del resultado obtenido sobre 100 replicaciones de bootstrapping.

El análisis filogenético de GVs, basado en las secuencias de granulina, agrupa a estos virus en dos *clusters*, uno que incluye a HbGV, CIGV, ChfuGV, CpGV, PbGV (grupo I), y otro que incluye a: XcGV y TnGV (grupo II). Bideshi *et al.* (2000) sugirieron que los GVs evolucionaron desde el grupo I hacia el grupo II y que esa evolución estaría relacionada también con la filogenia del huésped.

En el análisis filogenético realizado con la información disponible sobre helicadas I y II, se observa que si bien las helicadas de los GVs se agrupan separadamente de los NPVs, no se mantiene una relación entre los grupos de GVs sugeridos por Bideshi *et al.* 2000.

Por otra parte, sí se observa claramente el agrupamiento de los NPVs en los grupos I y II de acuerdo a lo informado previamente por Hernoiu *et al.* (2001).

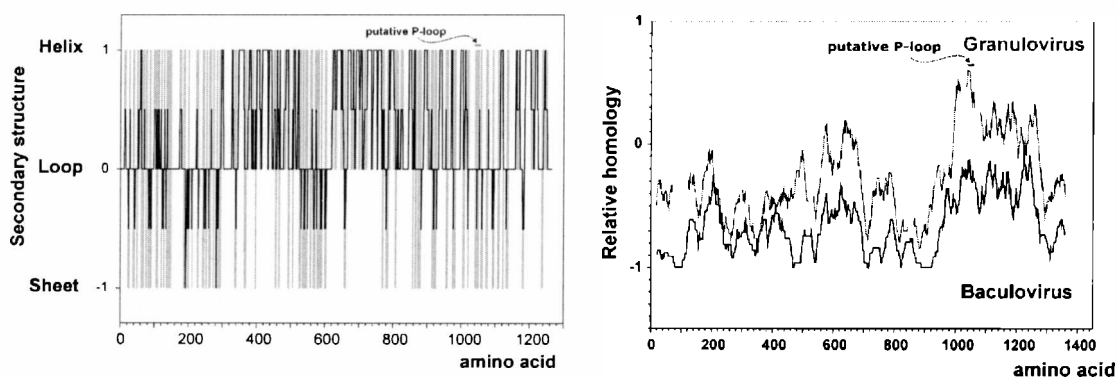
Esto confirma la necesidad de establecer los agrupamientos filogenéticos de baculovirus en base al análisis de diferentes genes y su ordenamiento, tal como fuera postulado por los últimos autores (Figura V.5).

V. 6) Estructuras secundarias y homologías relativas de las Helicasas I y II

Se realizó un análisis de predicción de la estructura secundaria y homología relativa para ambas proteínas sobre apilamiento de las secuencias conocidas para Helicasas I y II (Figura V.6). Este estudio se realizó con las mismas secuencias que se utilizaron en el análisis de filogenia.

En el análisis de estructura secundaria se observó que existe un perfil particular para cada una de las Helicasas de EpapGV, que difieren sensiblemente entre sí. Para Helicasa II se puede observar un patrón estructural más conservado y común a todas las Helicasas II analizadas. En cambio, el patrón de Helicasa I presenta un alto grado de variabilidad en su estructura (Figura V.6).

Helicasa I



Helicasa II

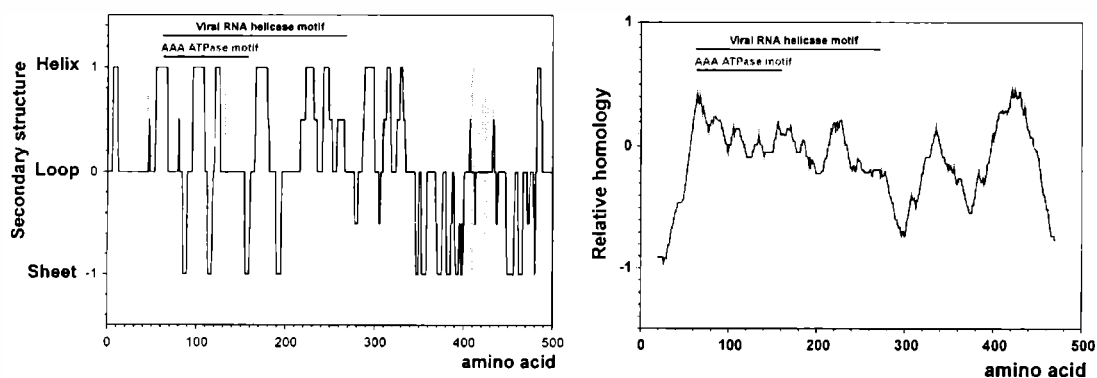


Figura V.6) Estructura secundaria y homología relativa de las Helicasas I y II, el consenso para cada estructura secundaria fue predicho para las tres posibles alternativas de estructura, hélice, b-hoja plegada y loop. (cuyos valores asignados fueron +1, -1 y 0). Las líneas negras corresponden al promedio de cada para posición y la barras verticales azules muestran la dispersión. Se describe también los motivos conservados para cada una de las Helicasas. A la derecha de cada gráfico de estructura secundaria se muestran los de homología relativa para cada una de las Helicasas.

En el análisis de homologías relativas, se encontró que Helicasa I posee un motivo *P-loop* típico de estas Helicasas (normalmente asociado a su función específica de desenrollamiento del DNA). Este motivo estaría involucrado en la función ATPasa (independiente de ATP) y sitio de unión al metal magnesio que presentan todas las Helicasas I (Bideshi y Federici, 2000).

Para las Helicasas II (informadas solo para los cuatro GVs que poseen completamente secuenciado su genoma) se encontró que todas pertenecerían a la Super Familia de las RNA Helicasas virales. Además para EpapGV se detectó la presencia del motivo AAA-ATPasa. Este motivo está involucrado en una amplia variedad de funciones celulares relativas al mantenimiento o *housekeeping* celular y que también incluye la función específica de helicasa. Se encontró también que la Helicasa II de CpGV posee el mismo motivo.

Sorprendentemente en XcGV y PxGV (cuyas Helicasas II presentan mayor homología con la de EpapGV) no se encontró la presencia del motivo AAA-ATPasa. Sin embargo se encontró homología con el motivo *UvrD/Rep*, el cuál solo está presente en XcGV y PxGV. Este motivo tiene la función de catalizar el desenrollamiento (ATP dependiente) del DNA doble cadena.

En general, los determinantes genéticos y los mecanismos moleculares que están relacionados a la patobiología de los baculovirus y su especificidad de rango de huésped permanecen aún desconocidos. En este sentido, las DNA helicasas de baculovirus tienen un rol esencial en la replicación viral y podrían también estar involucradas en la especificidad del rango de huésped. En este sentido se iniciaron los estudios de la presencia de genes de Helicasa en EpapGV.

En resumen, en este capítulo se ha informado la presencia de dos Helicasas para EpapGV, las mismas han sido secuenciadas y molecularmente estudiadas. Además se realizó el mapeo de los genes, se determinaron los ORFs flanqueantes a las mismas y se detectaron los mRNA específicos para cada una de las Helicasas.

Helicasa I – EpapGV, es una proteína de 1141 aa que posee aproximadamente un 34% de identidad y un 73% de homología con respecto a las Helicasas I de otros GVs. Las Helicasas I presentan una baja conservación estructural entre ellas, encontrándose la presencia de un motivo *P-loop* asociado normalmente a su función específica de Helicasas. El análisis de filogenia mostró que se mantiene la división de los NPVs en los grupos I y II, y que EpapGV se agrupa como un ente individual dentro de los GVs.

Helicasa II – EpapGV, es una proteína de 456 aa. La misma tiene 55% de identidad y 71% de homología con la más cercana Helicasa II baculoviral perteneciente a XcGV. Las cuatro Helicasas II de GVs se agruparían dentro de la Super Familia 1 de las RNA helicasas virales, presentando motivos diferentes que podrían re-definir su función.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El "barrenador de brotes" *Epinotia aporema* es una de las principales plagas de cultivos de interés económico, en particular del cultivo de soja. Para el control de esta plaga se deben aplicar insecticidas químicos de amplio espectro y alta toxicidad, en concentraciones superiores a las que usualmente son utilizadas para el control de otras plagas de soja. Esta situación impide la aplicación de un programa de manejo integrado de plagas (MIP) en este cultivo. Una alternativa al control químico que permitiría incluir el MIP en soja, sería el control biológico utilizando a los baculovirus como agente patogénico ya que estos virus constituyen la principal causa de mortalidad natural de *E. aporema*. En la actualidad, diferentes miembros de la familia *Baculoviridae* son empleados como insecticidas biológicos para el control de otras plagas agrícolas y forestales de importancia económica. Sin embargo, es necesario destacar que entre los inconvenientes que se presentan para el uso más amplio de estos bioinsecticidas es su baja velocidad de acción y su estrecho rango de huésped. Algunas de estas desventajas podrían solucionarse a través de la modificación genética dirigida del DNA viral, incluyendo determinados genes que afecten al desarrollo normal del insecto.

En virtud de desarrollar un bioinsecticida basado en un baculovirus y considerando los aspectos mencionados, es que en 1996 se inició el proyecto multidisciplinario "Caracterización de un Virus de la Granulosis y desarrollo de un insecticida para el control biológico de *Epinotia aporema*" sobre un aislamiento altamente virulento, EpapGV, obtenido en Oliveros (Santa Fe).

La introducción de modificaciones genéticas tendientes a mejorar el poder bioinsecticida del EpapGV, requirió realizar el clonado molecular del genoma del virus, el cual era completamente desconocido al momento de iniciar el proyecto. Esto constituyó la primera etapa de mi trabajo de Tesis. Con esta información se inició el estudio de factores virales asociados a la virulencia y patogenicidad del mismo. Específicamente en esta Tesis se estudió al gen *egt* y a su producto codificado, la enzima EGT. Asimismo se avanzó en la caracterización de genes virales asociados a la ampliación del rango de huésped. Por último, se desarrolló un método para el control de calidad del formulado bioinsecticida viral.

A continuación se enumeran, a modo de conclusiones, los logros obtenidos:

1. Por primera vez, se construyó una genoteca completa de EpapGV en *EcoR* I. Se determinó que los 120 kpb del DNA viral están comprendidos en ocho fragmentos con un rango de tamaños entre 28 kb y 0.31 kb. También se clonaron bibliotecas parciales de la secuencia de EpapGV en fragmentos de *Bgl* II, en *BamH* I y en *Hind* III. La determinación de la secuencia de los

extremos de estos fragmentos clonados permitió definir la ubicación de treinta y un ORFs y establecer el mapa de restricción del DNA viral (parte de estos estudios constituyen otra tesis doctoral).

2. En la región *EcoR* I/*Hind* III del fragmento C de 14.8 kb de la genoteca *EcoR* I de EpapGV, existen tres ORFs completos y uno parcial. Entre los ORFs completos, uno tiene alta homología con el gen *egt* que codifica para la enzima ecdisona glicosil transferasa (EGT), otro ORF corresponde al gen VP 1054 y otro al gen *me* 53. El ORF incompleto de aproximadamente 200 pb presenta alta homología con el gen de *granulina* que codifica para la proteína del cuerpo mayor de oclusión, Granulina (N*).
3. Los subclonados sucesivos del fragmento C de 14.8 kb permitieron obtener la secuencia completa del gen *egt* (1338 pb), el mismo codifica para una proteína de 446 aminoácidos. Por comparación, de la secuencia de aminoácidos predicha, con el resto de las EGTs publicadas en el GenBank para *Granulovirus*, se determinó que la enzima EGT tiene 53% de identidad y 76% de similitud con la más relacionada de las EGT (la del virus de la granulovirus de *Lacanobia oleracea*, LoGV).
4. El análisis teórico de la secuencia *upstream* del gen *egt*, permitió inferir que el gen se expresa bajo el control de un promotor temprano. Los ensayos de cinética de expresión del gen empleando las técnicas de *Northern blot* y RACE permitieron confirmar que efectivamente la expresión del gen *egt* se encuentra bajo el control de un promotor temprano (CAGT) ubicado a sólo ocho pares de bases *upstream* del ATG, siendo este el primer promotor de genes temprano de GVs que se ubica en una posición tan cercana al ATG.
5. El gen completo de *egt* de EpapGV, se amplificó con *primers* específicos y se clonó en diferentes vectores de expresión activos en sistemas tanto procariotes (*E. coli*) como eucariotes (la línea celular de insectos Sf 21).
6. La expresión de *egt* en *E. coli* permitió, por un lado, la purificación de la proteína con un rendimiento adecuado para la obtención de anticuerpos específicos y por el otro, determinar que el peso molecular aparente de la misma es 52.5 kDa.
7. La expresión del gen *egt* en Sf 21 permitió demostrar que efectivamente el gen *egt* es funcional ya que la enzima EGT es capaz de modificar a la hormona ecdisona por conjugación de la misma en presencia de UDP-Glucosa y UDP-Galactosa (ensayos de glicosilación).
8. Se demostró la funcionalidad del gen *egt* *in vivo* por ensayos de glicosilación empleando larvas infectadas y no infectadas recién mudadas. En las larvas

infectadas se observó que la ecdisona modificaba su velocidad de migración en TLC, probablemente debido a que había sufrido algún tipo de conjugación. Sorprendentemente, se observó que en las larvas no infectadas también existía modificación de la ecdisona y que la misma acompañaba a la evolución de la muda de *E. aporema*. Esta observación demuestra que la larva no infectada regula la actividad hormonal de la ecdisona a través de una modificación de la misma. Restaría determinar si esta modificación es similar a la que produce la expresión del gen *egt* de EpapGV.

9. En la genoteca *EcoR* I de EpapGV, se encontraron dos ORFs que presentan alta homología con los genes de *helicasa I* y *helicasa II* descritos en baculovirus. Los mismos se encuentran ubicados en los fragmentos E y C, respectivamente. Estos se caracterizaron molecularmente, encontrándose que codifican para proteínas de 1141 y 456 aminoácidos respectivamente. Por ensayos de *Northern blot* también se determinó que ambos genes se expresan en larvas infectadas con EpapGV. Un transcripto de 3.6 kb correspondiente a *helicasa I* se observó a las 36 hs *post* infección y a las 56 hs se detectó un segundo transcripto de 4.9 kb. Para *helicasa II* sólo se detectó un transcripto de 1.7 kb a las 48 hs *post* infección. El análisis de secuencia aminoacídica de ambos genes permitió ubicar filogenéticamente a los mismos y encontrar que la Helicasa I poseen motivos asociados a su función específica sobre el proceso de desenrollamiento de DNA. Por el contrario, Helicasa II posee el motivo AAA-ATPasas directamente asociado a las RNA Helicasas virales, el cual está relacionado a actividades de regulación transcripcional. La importancia del estudio de estos genes radica en el papel que los mismos podrían desempeñar en la definición del rango de huéspedes. El aislamiento y caracterización de estos genes permitirá evaluar si es posible extender el rango de huéspedes de EpapGV mediante la utilización de ensayos combinados con otros virus, tanto GVs como NPVs.
10. Finalmente, se desarrolló un método para el control de calidad de la formulación viral del bioinsecticida. El mismo se basó en el uso de la técnica de PCR empleando dieciséis pares de *primers* específicos para EpapGV diseñados a partir del conocimiento de menos del 8% del genoma total del virus. Los *primers* se usaron de manera individual y en conjunto, y generaron patrones tipo *fingerprint* para DNA de EpapGV. Se determinó que el ensayo es específico y que permite diferenciar EpapGV de otro granulovirus (CpGV) y de un poliedrovirus (AgMNPV). El límite de sensibilidad del método es comparable a otros métodos también basados en PCR publicados para baculovirus.

Perspectivas

1. En términos de lograr un bioinsecticida más eficiente, se podría modificar el DNA viral por delección del gen *egt*, de esta manera se lograría disminuir el tiempo letal medio del virus. Este experimento se encuentra postergado debido a la falta de líneas celulares susceptibles a EpapGV. Es por ello que primeramente se debería poner a punto la generación de una línea celular para lo cual existen informes preliminares que posibilitan el desarrollo de estos experimentos. Una alternativa a este procedimiento, sería tratar de realizar la delección del gen *egt* por recombinación *in vivo* en larvas de *E. aporema*.
2. Este tipo de experimentos podría ser usado también para analizar la participación de las helicasas en la definición de la especificidad del huésped susceptible.
3. Finalmente, la inesperada observación realizada sobre la modificación de la ecdisona en larvas no infectadas es de interés básico desde el punto de vista de la regulación hormonal de los estadios larvales y merece un análisis más extenso.

Con los resultados obtenidos en esta Tesis y los que se obtendrán de los experimentos propuestos se espera poder diseñar formulaciones virales nuevas, que sean más efectivas y aptas para ser utilizadas en un mayor rango de huéspedes.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J. R.; McClintock, J. T. 1991. Baculoviridae. Nuclear polyhedrosis viruses. Part 1. Nuclear polyhedrosis viruses of insects. In: Adams, J. R.; Bonami, J. R. Eds. Atlas of invertebrate viruses. Florida: CRC Press. p.89-160.
- Afonso C.L., Tulman E.R., Lu Z., Balinsky C.A., Moser B.A., Becnel J.J., Rock D.L., Kutish G.F. **Genome**. 2001 Sequence of a Baculovirus Pathogenic for *Culex nigripalpus*. *J Virol* 75,11157-65
- Ahrens, C.H., Russell, R.L., Funk, C.J., Evans, J.T., Harwood, S.H. & Rohrmann, S. H. 1997. The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* 229, 381-399.
- Akiyoshi, D. E., Chakerian, R., Rohrmann, G.F., Nesson, M.H. & Bequdreau, G. S. 1985. Cloning and sequencing of the granulin gene from the *Trichoplusia ni* granulosis virus. *Virology* 141, 328-332.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215, 403-410.
- Argaud, O., L. Croizier, M. López-Ferber y G. Croizier (1998). Two key mutations in the host-range specificity domain of the p143 gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus are required to kill *Bombyx mori* larvae. *J. Gen. Virol.* 79: 931-935.
- Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J. Lopez-Ferber, M., & Possee 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 202, 586-605.
- Bah, A., Bergeron, J., Arella, M., Lucarotti, C.J. & Guertin, C. 1997. Identification and Sequence Analyses of the Granulin gene of *Choristoneura fumiferana* Granulovirus. *Arch. Virol.* 142, 1577-1584.
- Barrett, J. W., Krell, P. J. & Arif, B. M. 1995. Characterization, sequencing and phylogeny of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene from two distinct nuclear polyhedrosis viruses isolated from *Choristoneura fumiferana*. *Journal of General Virology* 76, 2447-2456.
- Barrett, J.W., Brownwright, A.J., Primavera, M.J., Palli, S.R. 1998. Studies of the nucleopolyhedrovirus infection process in insects by using the green fluorescence protein as a reporter. *Journal of Virology* 72:337-82.
- Beaton CD, Filshie BK. 1976. Comparative ultrastructural studies of insect granulosis and nuclear polyhedrosis viruses. *J Gen Virol.* May;312:151-61
- Becnel, J. J., White, S. E., Moser, B. A., Fukuda, T., Rotstein, M. J., Undeen, A. H. & Cockburn, A. 2001. Epizootiology and transmission of a newly discovered baculovirus from the mosquitoes *Culex nigripalpus* and *C. quinquefasciatus*. *Journal of General Virology* 82, 275-282.
- Belarmino, L.C. 1992. Avaliação economica de inseticidas biológicos. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 27: 371-389.
- Benz, G. A., 1988, in The Biology of Baculoviruses eds Granados, R. R. and Federici, B. A., CRC Press, Boca Raton, vol. 1, pp. 1-35.
- Bernard P, Couturier M. 1992 Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol.* Aug 5;226:735-45.
- Bernard P, Steyaert J, Van Melderden L, Thi MH, Loris R, Wyns L, Couturier M. 1993. Purification, circular dichroism analysis, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the F plasmid CcdB killer protein. *J Mol Biol.* 1993 May 20;231:513-5.
- Bianchi, F.J., Snoeijs, I., van der Werf, W., Mans, R. M., Smits, P.H. & Viak, J.M. 2000. Biological activity of SeMNPV, AcMNPV, and three AcMNPV deletion mutants against *Spodoptera exigua* larvae. *Noctuidae. Journal of Invertebrate Pathology* 75, 28-35.
- Bideshi, D.K., Bigot, Y. & Federici, B.A. 2000. Molecular characterization and phylogenetic analysis of the *Harrisina brillians* granulovirus granulin gene. *Arch. Virol.* 145, 1933-1945.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513-1523.
- Bischoff, D. S., and J. M. Slavicek. 1997. Molecular Analysis of an *enhancin* Gene in the *Lymantria dispar* Nuclear Polyhedrosis Virus. *J.Virol.* 71: 8133-8140.
- Blissard, G. W., Black, B., Crook, N., Keddie, B. A., Possee, R., Rohrmann, G., Theilmann, D., and Volkman, L. 2000. Family Baculoviridae. In: Taxonomy of Viruses: VII Report of the International Committee on Virus Taxonomy M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner, Eds., pp. 195-202. Academic Press, London.
- Blissard, G. W., Kogan, P. H., Wei, R. & Rohrmann, G. F. 1992. A synthetic early promoter from a baculovirus: roles of the TATA box and conserved start site CAGT sequence in basal levels of transcription. *Virology* 190, 783-793.
- Blissard, G.W. & Rohrmann, G.F. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology* 35, 127-155.
- Blissard, G.W. 1996. Baculovirus-insect cell interactions. In: *Insect Cell Cultures: Fundamental and Applied Aspects*. Viak, J.M., de Gooijer, C.D., Tramper, J., Millenburger, H.G. eds.. Kluwer Academic Publishers, pp 73-94.
- Braunagel SC and Summers MD 1994 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: Structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. *Virology* 202: 315-328.
- Braunagel, S.C., He, H., Ramamurthy, P. and Summers, M.D. 1996b. Transcription, translation, and cellular localization of three *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural proteins: ODV-E18, ODV-E35, and ODV-EC27. *Virology* 222: 100-114
- Bulach, D., Kumar, C.A., Zaia, A., Liang, B. & Tribe, D. 1999 Group II. *Nucleopolyhedrovirus* Subgroups Revealed by Phylogenetic Analysis of Polyhedrin and DNA polymerase Gene Sequences. *J. Invertebr. Pathol.* 73, 59-73.
- Burand JP, Horton HM, Retnasami S, Elkinton JS. 1992. The use of polymerase chain reaction and shortwave UV irradiation to detect baculovirus DNA on the surface of gypsy moth eggs. *J Virol Methods.* Feb;36:141-9.
- Burand JP, Summers MD and Smith G 1980 Transfection with baculovirus DNA. *Virology* 101: 286-290.
- Caballero, P., Williams, T. & López-Ferber, M. 2001 Estructura y taxonomía de los baculovirus. In: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Caballero, P., López-Ferber, M. & Williams, T. eds., pp. 15-46. Phytoma S.A., Valencia, España.
- Cap Sciocco Alicia. 2001. Biología y patogénesis de los baculovirus. En: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Caballero, P., López-Ferber, M. & Williams, T. eds., Cap. 2 pp. 47-72. Phytoma S.A., Valencia, España.
- Carstens, E.B., Tjia, S.T. and Doerfler, W. 1979. Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. I. Synthesis of intracellular proteins after virus infection. *Virology* 99: 386-398
- Chakerian, R., Rohrmann, G.F., Nesson, M.H., Leisy, D.J. & Beaudreau, G.S. 1985. The nucleotide sequence of the *Pieris brassicae* granulosis virus granulin gene. *J. Gen. Virol.* 66, 1263-1269.
- Chapman, R. F. 1998 Endocrine system. Chap 21, pp 570-584. In: *The insects: structure and function*. 4th edition. Cambridge University Press.
- Charlton CA, Volkman LE. 1991. Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J Virol.* Mar;65:1219-27.
- Charlton, C.A. and Volkman, L.E. 1995. Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology* 1993 Nov;197:245-54
- Chen CJ, Quentin ME, Brennan LA, Kukel C, Thiem SM (1998) *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus *hrf-1* expands the larval host range of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* 72: 2526-2531

- Chen, X., Hu, Z., Jehle, J. A., Zhang, Y. & Viak, J. M. 1997. Analysis of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Heliothis armigera* single-nucleocapsid baculovirus. *Virus Genes* 15, 219-225.
- Chen, X., Ijkel, W.F., Tarchini R., Sun, X., Sandbrink, H., Wang, H., Peters S., Zuidema D., Lankhorst, R.K., Viak, J. M., & Hu Z. 2001. The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol*, 82, 241-257.
- Chen, X., Sun, X., Hu, Z., Li, M., O'Reilly, D. R., Zuidema, D. & Viak, J. M. 2000. Genetic engineering of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus as an improved pesticide. *Journal of Invertebrate Pathology* 76, 140-146.
- Chisholm, G.E. and Henner, D.J. 1988 Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. *J. Virol.*, 62, 3193-3200.
- Chomczynski P & Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9.
- Chou CM, Huang CJ, Lo CF, Kou GH, Wang CH. 1996. Characterization of *Perina nuda* nucleopolyhedrovirus PenuNPV polyhedrin gene. *J Invertebr Pathol*, May;673:259-66.
- Christian PD, Gibb N, Kasprzak AB, Richards A., 2001. A rapid method for the identification and differentiation of *Helicoverpa* nucleopolyhedroviruses NPV Baculoviridae isolated from the environment. *J Virol Methods*. Jul;961:51-65
- Clarke, E. E., Tristem, M., Cory, J. S. & O'Reilly, D. R. 1996. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene from the *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* 77, 2865-2871.
- Cochran, M.A. and Faulkner, P. 1983. Localization of homologous DNA sequences interspersed at five regions in the baculovirus AcMNPV genome. *Journal of Virology* 45, 961-970.
- Corsaro, B.G., Gijzen, M., Wang, P., Granados, R.R. 1993. Baculovirus enhancing proteins as determinants of viral pathogenesis. In *Parasites and Pathogens of insects* 2, 127-145.
- Croizier, G., L. Croizier, O. Argaud y D. Poudevigne. (1994). Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 48-52.
- Croizier, L., Taha, A., Croizier, G. and Lopez Ferber, M. 2002. The complete sequence of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*, granulovirus. Genbank gi21686665[ref|NC_004062.1]
- Crook N.E. 1981. Genetic variability and virulence characteristics of granulosis viruses isolated from *Pieris* spp., p.291. En: Abstracts of the 5th International Congress of Virology, Strasbourg, Francia.
- Crook, N. E. 1991. Baculoviridae: Subgroup B: Comparative aspects of granulosis viruses. In *Viruses of Invertebrates*, pp. 73-110. Edited by E. Kurstak. New York: Marcel Dekker.
- Crook, N. E., Clem, R. J. & Miller, L. K. 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc-finger like motif. *Journal of Virology* 67, 2168-2174.
- Crook, N. E., James, J. D., Smith, I. R. & Winstanley, D. 1997. Comprehensive physical map of the *Cydia pomonella* granulovirus genome and sequence analysis of the granulins gene region. *Journal of General Virology* 78, 965-974.
- Crook, N. E., Spencer, R. A., Payne, C. C. & Leisy, D. J. 1985. Variation in *Cydia pomonella* granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants. *Journal of General Virology* 66, 2423-2430.
- Crook, N.E. 1986. Restriction enzymes analysis of granulosis virus isolated from *Artogeia rapae* and *Pieris brassicae*. *J. Gen. Virol.* 67, 781-787.
- Cuff, J. A. & Barton, G. J. (1999). Evaluation and improvement of multiple sequence methods for protein secondary structure prediction. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 34, 508-519.
- Cuff, J. A., Clamp, M. E., Siddiqui, A. S., Finlay, M. & Barton, G. J. (1998). JPred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics* 14, 892-893.
- Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M. & Orcutt, B.C. 1978. Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5 supplement 3, Dayhoff, M.O. ed., NBRF, Washington, p. 345.
- de Moraes RR, Maruniak JE, Funderburk JE., 1999. Methods for detection of *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus DNA in soil. *Appl Environ Microbiol*. Jun;656:2307-11.
- de Moraes RR, Maruniak JE., 1997. Detection and identification of multiple baculoviruses using the polymerase chain reaction PCR and restriction endonuclease analysis. *J Virol Methods*. Jan;631:2:209-17.
- Derksen, A.C.G., Granados, R.R. 1988. Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculovirus and enhancement of viral infection. *Virology* 167, 242-250.
- Díaz, B., and Díez, S. 1989. Presencia de un virus de la granulosis en larvas de *Epinotia aporema* Wals., en cultivos de soja. IV Conferencia Mundial de Investigación en soja Vol. III, pp.1588-1592.
- Dwyer, K.G., & Granados, R.R. 1987. A physical map of the *Pieris rapae* granulosis virus genome. *J. Gen Virol.* 68, 1471-1476.
- Eckhardt, T. 1978. A rapid method for identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1: 584-588.
- Engelhard, E.K., Kam-Morgan, L.N., Washburn, J.O. and Volkman, L.E. 1994. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3224-3227
- England LS, Trevors JT, Holmes SB., 2001. Extraction and detection of baculoviral DNA from lake water, detritus and forest litter. *J Appl Microbiol*. Apr;904:630-6.
- Entwistle, P.F. 1998. A world survey of virus control of insect pests, pp. 189-200. In F. R. Hunter-Fujita, P.F. Entwistle, H.F. Evans, and N. E. Crook ed., "Insect Viruses and Pest Management". John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Evans, O. P. & O'Reilly, D. R. 1999. Expression and structural characterization of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Journal of General Virology* 80, 485-492.
- Evans, O.P. & O'Reilly, D.R. 1998. Purification and kinetic analysis of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Biochemistry Journal* 330, 1265-1270.
- Faktor O, Raviv D., 1996. A polymerase chain reaction for the detection of nucleopolyhedroviruses in infected insects: the fate of the *Spodoptera littoralis* virus in *Locusta migratoria*. *J Virol Methods*. Sep;611-2:95-101.
- Faktor, O., Toister-Achituv, M. & Kamensky, B. 1995. Identification and nucleotide sequence of an ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Spodoptera littoralis* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virus Genes* 11, 47-52.
- Federici, B. 1997. Baculovirus pathogenesis. In *The Baculoviruses*, pp. 33-60. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.
- Federici, B. A. 1993. Viral pathobiology in relation to insect control. In "Parasites and Pathogens of Insects" N. Beckage, B.A. Federici & N. Thompson, Eds Vol. 2, pp. 81-101. Academic Press, San Diego
- Federici, B.A. 1986. Ultrastructure of Baculoviruses, en: *The biology of baculoviruses*, Vol. I, pp 61-88, R.R. Granados and B.A. Federici, eds, CRC Press Boca Raton, FL
- Felsenstein, 1993. PHYLIP Phylogeny Inference Package. Version 3.5. Univ. of Washington, Department of Genetics, Seattle.
- Felsenstein, J. 1996. Inferring phylogenies from protein sequences by parsimony, distance, and likelihood methods. *Methods Enzymology* 266, 418-427.
- Finnerty CM, Li G, Granados R.R. 2000. Characterization of a granulovirus from the cassava hornworm *Erinnyis ello*: Sphingidae. *J Invertebr Pathol*. 754:273-8.

- Flipsen, J. T. M*, J. W. M. Martens, M. M. Van Oers, J. M. Vlak, and J. W. M. van Lent. 1995. Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae. *Virology* 208:328-335.
- Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., Brown, F. 1991 Classification and nomenclature of viruses: fifth report of International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch. Virol. Suppl. 2. Springer-Verlag, New York
- Friesen PD and Miller LK 1986 The Regulation of Baculovirus Gene Expression. In Current Topics in Microbiology and Immunology. Doerfler W and Böhm, P eds. 131: 31-49. Springer-Verlag, Berlin.
- Friesen, P. D. 1997. Regulation of baculovirus early gene expression. In *The Baculoviruses*, pp. 141-170. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.
- Fuente. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina -1992 Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes -CASAFA- 1.1.67 páginas
- Funk, C.J.; Braunagel, S.C. & Rohrmann, G.F. 1997. Baculovirus structure, pp. 7-32. In: L.K. Miller ed., *The Baculoviruses*. New York: Plenum Press.
- Giorda, L. y Baigorri, H. 1998. El cultivo de soja en Argentina. INTA
- Glocker, B., Hoopes, R. R., Jr., Hodges, L., and Rohrmann, G. F. 1993. In vitro transcription from baculovirus late gene promoters: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts prepared from infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* 67, 3771-3776.
- Goldberg, A., M. A. Manzán, P. Daniel Ghiringhelli, Alicia Sciocco-Cap, and Victor Romanowski. 2002 Identification and sequence analysis of a putative EpapGV envelope fusion protein. Society for Invertebrate Pathology, SIP-2002. Iguazu. Brasil.
- Goldberg, A.; Romanowski, V. B. Federici and A. Sciocco-Cap (1999). Effects of a *Epinotia aporema* granulovirus (EpapGV) on its natural host. 32nd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, University of California Irvine (Estados Unidos).
- Gomi, S., Ecale Zhou, C., Yih, W., Majima, K. and Maeda, S. 1997 Deletion analysis of eighteen late gene expression gene homologues of the baculovirus BmNPV. *Virology* 230, 35-47
- Gomi, S., Majima, K., & Maeda, S. 1999. Sequence analysis of the genome of *Bombix mori* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen Virol.* 80, 1323-1337.
- Goto, C., Tsutsui, H., Honma, K., Iizusa, T. & Nakajima, T. 1985. Studies on nuclear polyhedrosis and granulosis virus of the spotted cutworm, *Xestia c-nigrum* L. *Applied Entomology and Zoology* 29, 102-106.
- Goto, C., Minobe, Y., & Iizuka, T. 1992. Restriction endonuclease analysis and mapping of the genomes of granulosis viruses isolated from *Xestia c-nigrum* and five other noctuid species. *J. Gen. Virol.* 73, 1491-1497.
- Gould, F. "Comments of Fred Gould on Plant pesticide management". Department of Entomology. North Carolina State University. EPA. Meeting on Plant Pesticide Resistance Management. March 14, 1997.
- Gould, F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars. Integrating Pest Genetics and Ecology. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 701-726.
- Granados R.R. and Federici B.A. 1986 The Biology of Baculoviruses. Vol I. Biological Properties and Molecular Biology. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Granados RR 1978 Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. *Virology* 90: 170-174
- Granados RR and Lawler KA 1981 In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* 108: 297-308.
- Granados, R.R. & Williams, K.A. 1986. In vivo infection and replication of baculovirus. In: Granados, R.R. & Federici, B.A. Eds. *The biology of baculoviruses*. Florida: CRC Press, v.1, p.89-108.
- Greene, G. L., Leppla, N. C. & W. A. Dickerson. 1976. Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology* 69, 487-488.
- Griffiths CM, Barnett AL, Ayres MD, Windass J, King LA, Possee RD (1999) In vitro host range of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus recombinants lacking functional p35, iap1 or iap2. *J Gen Virol*;80:1055-66
- Gröner, A. 1986. Specificity and Safety of Baculoviruses. P. 177-202. En: R.R. Granados y B.A. Federici ed, *The Biology of Baculoviruses : biological properties and molecular biology*, Vol 1. Academic Press, San Diego, CA.
- Groner, A. 1989. Safety to non target invertebrates of baculoviruses. In: Safety of Microbial Insecticides. Lacey, L. & Davison. E.U. eds.. CRC Press, pp. 135-147.
- Gross CH, Russell RL, Rohrmann GF. 1994. *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure. *J Gen Virol.* May;75 Pt 5:1115-23
- Gruia, M. A., P. L. Buller, and R. F. Weaver. 1981. a-Amanitin-resistant viral RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus-infected *Heliothis zea* larvae and *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* 38:916-921.
- Guarino, L. A., and M. Smith. 1992. Regulation of delayed-early gene transcription of dual TATA boxes. *J. Virol.* 66:3722-3739.
- Guarino, L. A., and W. Dong. 1991. Transient expression of an enhancer-binding protein in insect cells transfected with the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE1 gene. *J. Virol.* 65: 3676-3680.
- Guarino, L. A., B. Xu, J. Jin, and W. Dong. 1998a. A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus - infected cells. *J. Virol.* 72:7985-7991.
- Guarino, L. A., J. Jin, and W. Dong. 1998b. Guanylyltransferase activity of the LEF-4 subunit of baculovirus RNA polymerase. *J. Virol.* 72:10003-10010.
- Guarino, L.A. and Summers, M. D. 1986. Interspersed homologous DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhances delayed early gene expression. *Journal of Virology* 60, 215-223.
- Hang, X. and Guarino, L.A. 1999. Purification of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus DNA polymerase from infected insect cells. *J. Gen. Virol.* 80: 2519-2526.
- Hashimoto Y, Corsaro BG, Granados RR. 1991. Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis virus. *J Gen Virol.* Nov;72 Pt 11:2645-51.
- Hashimoto, Y., Hayakawa, T., Ueno, Y., Fujita, T., Sano, Y. & Matsumoto, T. 2000. Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. *Virology* 275, 358-372.
- Hashimoto, Y., Hayashi, K., Okuno, Y., Hayakawa, T., Saimoto, A., Granados, R. R., & Matsumoto, T. 1996. Physical mapping and Identification of interspersed homologous sequences in the *Trichoplusia ni* granulosis virus genome. *J. Gen Virol.* 77, 555-563.
- Hawtin, R.E., Zarkowska, T., Arnold, K. Thomas, C.J., Gooday, G.W., King, L.A. Kuzio, J.A. and Possee, R.D. 1997. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* 238: 243-253.
- Hayakawa T, Rohrmann, G.F. and Hashimoto Y. (1999) Patterns of genome organization and content of lepidopteran baculoviruses. *Virology* 278: 1-12
- Hayakawa, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S.I., Goto, C. & Maeda, S. 1999. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology* 262, 277-297.
- Hayakawa, T., Rohrmann, G. F. & Hashimoto, Y. 2000. Patterns of genome organisation and content in lepidopteran baculoviruses. *Virology* 278, 1-12.
- Heldens, J. G. M., Broer, R., Zuidema, D., Goldbach, R.W. and Vlak, J. M. 1997. Identification and functional analysis of a non-hr origin of DNA replication in the genome of *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, 78, 1497-1506.
- Herniou, E.A., Luque T., Chen, X., Vlak, J.M., Winstanley, D., Cory, J.S., O'Reilly, D.R. 2001 Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. *J Virol.* 75, 8117-8126.

- Herz, A., Kleespies, R., Huber, J., Chen, X., and Vlak, J. 2001. Unusual pathogenesis of the HaSNPV in the heterologous host *Spodoptera exigua*. XXXIV Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, p. 33.
- Hess RT, Falcon LA. 1978. Electron microscope observations of the membrane surrounding polyhedral inclusion bodies of insects. *Arch Virol*;561-2:169-76.
- Hill JE, Kuzio J, Wilson JA, MacKinnon EA, Faulkner P. 1993. Nucleotide sequence of the p74 gene of a baculovirus pathogenic to the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Biochim Biophys Acta* Feb 20;11721-2:187-9.
- Hom, L.G. & Volkman, L.E. 2000. *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus *chiA* is required for processing of V-CATH. *Virology*. 277, 178-183
- Hoopes RR and Rohrmann GF 1991. In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: Accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 4513-4517.
- Horton, H.M. and Burand, J.P. 1993. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *J. Virol.* 67: 1860-1868.
- <http://saenzpe.inta.gov.ar/Cereales/soja.htm> Febrero/2000
- <http://www.agrovision.com.ar/38/Manejo-plagas-soja.htm>.
- Hu, Z. H., Broer, R., Westerlaken, J., Martens, J. W., Jin, F., Jehle, J. A., Wang, L. M. & Vlak, J. M. 1997. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of a single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Buzura suppressaria*. *Virus Research* 47, 91-97.
- Hu, Z.H., Arif, B.M., Martens, J.W.M., Chen, X.W., Sun, J.S., Zuidema, D., Goldbach, R.W. & Vlak, J. M. 1998. Distinct gene arrangement in the *Buzura suppressaria* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J. Gen Virol.* 79, 2841-2851.
- Huber, J. 1986. Use of baculoviruses in pest management programs. In "The biology of Baculoviruses" R.R. Granados, and B. A. Federici, Eds. Vol. I., pp181-202. C.R.C. Press, Boca Raton, FL.
- Hughes, P.R., Van Beek, N.A., Wood, H.A. 1986. A modified droplet feeding method for rapid assay of *Bacillus thuringiensis* and baculoviruses in noctuid larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 37, 154-157.
- Hunter-Fujita, P. Entwistle; H.Evans, and N. Crook. 1998. *Insect Viruses and Pest Management*. F. Hunter-Fujita, P. Entwistle; H.Evans, and N. Crook eds. Wiley & Sons, New York, 620 p.
- Hyink, O., Graves, S., Fairbairn, F.M. & Ward, V.K. 1988. Mapping and Polyhedrin Gene Analysis of the *Epiphyas postvittana* Nucleopolyhedrovirus Genome. *J. Gen. Virol.* 78, 2853-2862.
- Ianonne, N., Parisi, R., & Dagoberto, E. 1987. "Incidencia del barrenador de los brotes" *Epinotia aporema* Wals., en soja. EEA-INTA Pergamino, *Informe Técnico*. 209, 1-24.
- Iede, E.T. y Foerster, 1982. Biología de *Epinotia aporema* Walshingham, 1914 Lepidoptera: Tortricidae em soja. *Anais Soc. Entom. Brasil.* 11: 13-21.
- Ijkel, W. F., van Strien, E. A., Heldens, J. G., Broer, R., Zuidema, D., Goldbach, R. W. & Vlak, J. M. (1999). Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology* 80, 3289-3304.
- Ijkel, W.F.J., van Strien, E., Heldens, G.M., Broer, R., Zuidema, D., Goldbach, R., & Vlak, J.M. 1999. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* Multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J. Gen Virol.* 80, 3289-3304.
- Jacobsen CS. 1995., Microscale detection of specific bacterial DNA in soil with a magnetic capture-hybridization and PCR amplification assay. *Appl Environ Microbiol.* Sep;619:3347-52.
- Jehle, J. A. & Backhaus, H. 1994. The granulin gene region of *Cryptophlebia leucotreta* granulosis virus: sequence analysis and phylogenetic considerations. *Journal of General Virology* 75, 3667-3671.
- Jehle, J. A., Backhaus, H., Evans, E., and Huber, J. 1992. Physical map of the *Cryptophlebia leucotreta* granulosis genome and its relationship to the genome of *Cydia pomonella* granulosis virus. *J.Gen. Virol.* 73:1621-1626.
- Kamita, S. G. y S. Maeda (1993). Inhibition of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus replication by the putative DNA helicase gene of *Autographa californica* NPV. *Journal of Virology* 67: 6239-6247.
- Kamita, S. G. y S. Maeda, S. (1997). Sequencing of the putative DNA helicase-encoding gene of the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and fine-mapping of a region involved in host range expansion. *Gene* 190: 173-179.
- Kang, W., Tristem, M., Maeda, S., Crook, N. E. & O'Reilly, D. R. 1998. Identification and characterization of the *Cydia pomonella* granulovirus cathepsin and chitinase genes. *Journal of General Virology* 79, 2283-2292.
- Kawakami, A., Kataoka, H., Oka, T., Mizoguchi, A., Kimura-Kawakami, M., Adachi, T., Iwami, M., Nagasawa, H., Suzuki, A. and Ishizaki, H. 1990. Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone PTTH. *Science* 247 4948, 1333-1335.
- Kawamoto F, Kumada N, Kobayashi M. 1977. Envelopment of the nuclear polyhedrosis virus of the oriental tussock moth, *Euproctis subflava*. *Virology*, Apr;772:867-71.
- Keddie BA, Aponte GW, Volkman LE. 1989. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science*. Mar 31;2434899:1728-30.
- Keeley LL, Vinson SB. 1975. beta-Ecdysone effects on the development of nucleopolyhedrosis in *Heliothis* spp. *J Invertebr Pathol*, Jul;261:121-3.
- Kirkpatrick BA, Washburn JO, Engelhard EK, Volkman LE. 1994. Primary infection of insect tracheae by *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. Aug 15;2031:184-6
- Kitts, P. and Possee, R. (1993) A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *BioTechniques*, 14, 810-814.
- Kogan, P.H., Chen, X. & Blissard, G.W. 1995. Overlapping TATA-dependent and TATA-independent early promoter activities in the baculovirus gp64 envelope fusion protein gene. *Journal of Virology* 69, 1452-1461.
- Kondo, A. y S. Maeda. (1991). Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 65: 3625-3632.
- Kool M, Ahrens CH, Goldbach RW, Rohrmann GF and Vlak JM 1994b. Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 91: 11212-11216.
- Kool, M., C. H. Ahrens, J. M. Vlak, and G. F. Rohrmann. 1995. Replication of baculovirus DNA. *J. Gen. Virol.* 76:2103-2118.
- Kool, M., Goldbach, R. W. and Vlak, J. M. 1994a. A putative non-hr origin of DNA replication in the HindIII-K fragment of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* 75, 3345-3352.
- Kool, M., Van Den Berg, P. M. M. M., Tramper, J., Goldbach, R. W. and Vlak, J. M. 1993a. Location of two putative origins of DNA replication of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 192, 94-101.
- Kovacs, G.R., Guarino, L.A., Graham, B.L. and Summers, M.D. 1991a. Identification of specific baculovirus RNAs expressed late in infection. *Virology* 185, 633-643.
- Kozlov, E.A., Rodnin, N.V., Levitina T.L., Gusak, M.M., Radomskij, N.F., & Palchikovskaya, L. J. 1992. The amino acid sequence determination of a granulin and polyhedrin from two baculoviruses infecting *Agrotis segetum*. *Virology* 189, 320-323.

- Kukan B. 1999. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects. *J Invertebr Pathol.* Sep;74:103-11
- Kuzio J, Jaques R, Faulkner P. 1989. Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology* Dec;173:759-63.
- Kuzio, J., Pearson, M., Harwood, S.H., Funk J.C., Evans J. T., Slavicek J. M., & Rohrmann, F. 1999. Sequence and Analysis of the Genome of a Baculovirus Pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology* 253, 17-34.
- Kuzio, J., Pearson, M.N., Harwood, S.H., Funk, C.J., Evans, J.T., Slavicek, J.M. and Rohrmann, G.F. (1999). Sequence analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology* 253, 17-34.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature London* 227:680-685.
- Lanier LM, Slack JM, Volkman LE. 1996. Actin binding and proteolysis by the baculovirus AcMNPV: the role of virion-associated V-CATH. *Virology*, Feb 15;216:380-8.
- Lehmann, V y Pengue, W, 2000. Herbicide tolerant soybean: Just another step in a technology treadmill?. *Biotechnology and Development Monitor*. Nº 43. Setiembre.
- Lepore LS, Roelvink PR, Granados RR. 1996. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus NPV infections, is a metalloprotease. *J Invertebr Pathol.* Sep;68:131-40
- Li, L., Harwood, S.H. and Rohrmann, G.F. 1999. Identification of additional genes that influence baculovirus late gene expression. *Virology* 255, 9-19.
- Li, X., & Benz, G. 1994 Restriction endonuclease analysis of the granulosis virus of *Adoxophyes orana* F.V.R. Lep., Tortricidae. *Bull. OILB/SROP*, 17, 244-247.
- Liu, J.C. and Maruniak, J.E. 1995. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the gp41 gene of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* 76: 1443-1450
- Lu, A. and Miller, L.K. 1997 Generation of recombinant baculoviruses by direct cloning. *BioTechniques* 21, 63-67.
- Luque, T. Finch, R. Crook, N. O'Reilly, D. & Winstanley, D. 2001. *J Gen Virol* 82, 2531-47.
- Luthy, P., Cordier, J. L., and Fischer, H. M. 1982. Bacillus thuringiensis as a bacterial insecticide: basic considerations and application. En "Microbial and viral pesticides" E. Kurstak, Ed., pp. 35-74. Marcel Dekker, New York.
- Maeda, S., Kamita, S.G., Kondo, A. (1993). Host range expansion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (NPV) following recombination of a 0.6-kilobase-pair DNA fragment originating from *Bombyx mori* NPV. *Journal of Virology* 67, 6234-6238.
- Manzán, M. A., Lozano, M.E., Ghiringhelli, P.D., Sciocco-Cap, A., and Romanowski, V. (1999). Molecular cloning of the *Epinotia aporema* granulovirus genome and identification of the egt gene. Abstracts XXXII Meeting of the S.I.P., U.C. Irvine, p. 57
- Manzán, M. A., M.E. Lozano, A. Sciocco-Cap, P.D. Ghiringhelli and V. Romanowski. 2002. Identification and characterization of the ecdysteroid UDP-glycosyltransferase gene of *Epinotia aporema* granulovirus., *Virus Genes* 24, 119-130.
- Manzán, M. A., Sciocco-Cap, P.D. Ghiringhelli and V. Romanowski. Multiplex PCR and quality control of EpapGV production. (2002). (Submitted for publication).
- Manzán, M.A., Garcia, A; E. Arana; Cap, A; Ghiringhelli, P.D; Romanowski, V. 2002 Identification and molecular characterization of *Epinotia aporema* granulovirus helicase genes. Society for Invertebrate Pathology, SIP-2002. Iguazu. Brasil.
- Martignoni ME. 1978. Production of TM-Biocontrol. pp. 140-143. In: Brookes MH, RW Stark, and RW Campbell [eds.]. The Douglas-fir tussock moth: a synthesis. U.S. Dept. Agric. Tech. Bull. 1585: 1-331. Included as 2.12a of USDA 1988.
- Martignoni ME. 1999. History of TM-Biocontrol: the First Registered Virus-Based Product for Control of a Forest Insect. *Am. Entomol.* 451:30-37
- Martignoni, M. E.; and Iwai, P. J. 1981. A catalogue of viral diseases of insects, mites and ticks. Pages 897-991. In Burges, H. D. ed. *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*, 1970-1980. London: Academic Press Inc.
- Martignoni, M. E.; and Iwai, P. J. 1986. A Catalogue of Viral Diseases of Insects, Mites, and Ticks. USDA Forest Service, Pacific Northwest Research Station, Portland, OR, General Technical Report PNW-195, 4th Ed., 51 pp.
- Maruniak, J.E. 1986. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: *The Biology of Baculoviruses*. Vol. 1. Granados, RR. and Federici, B.A. eds. CRC Press, Florida, pp. 129-146.
- McDougall, V.V. and Guarino, L.A. 1999. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase: measurements of processivity and strand displacement. *J. Virol.* 73: 4908-4918.
- Méndez, R., Karacsonyi, C., M.A. Manzán, E.I. Arana, A. Sciocco-Cap, P.D. Ghiringhelli and V. Romanowski. 2002. A transfer vector for the generation of recombinant AgMNPVs containing large insertions of foreign DNA. Society for Invertebrate Pathology, SIP-2002. Iguazu. Brasil.
- Miller LK, Dawes KP 1979. Physical Map of the DNA genome of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 29:1044-1055
- Miller LK, Dawes KP. Restriction endonuclease analysis for the identification of baculovirus pesticides. *Appl Environ Microbiol.* 1978 Feb;35:411-21.
- Miller LK, Dawes KP., 1978. Restriction endonuclease analysis to distinguish two closely related nuclear polyhedrosis viruses: *Autographa californica* MNPV and *Trichoplusia ni* MNPV. *Appl Environ Microbiol.* 1978 Jun;35:1206-10.
- Miller LK, Jewell JE, Browne D. 1981. Baculovirus induction of a DNA polymerase. *J Virol* 1981 Oct;40:1305-8.
- Miller, L. 1996. Insect viruses. In: *Fields Virology*. Third Edition. Raven Publishers, Philadelphia, pp.553-556.
- Monsma, S. A., Oomens, A. G. P. and Blissard, G. W. 1996. The gp64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *Journal of Virology* 70, 4607-4616.
- Mori, H., Nakazawa, H., Shirai, N., Shibata, N., Sumida, M. and Matsubara, F. (1992). Foreign gene expression by a baculovirus vector with an expanded host range. *J. Gen. Virol.* 73: 1877-1880
- Moscardi, F y Carvalho, R. 1992. Consumo e utilização de folhas de soja por *Anticarsia gemmatilis* Hub. *Lepidoptera: Noctuidae* infectada, em diferentes estádios larvais, por seu vírus de poliedrose nuclear. *Anais Societade Entomológica do Brasil* 22 2:267-280
- Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of *Lepidoptera*. *Ann. Rev. Entomol.* 44, 257-289.
- Moscardi, F., Alien G.E., and Greene G.L. 1981. Control of the velvetbean caterpillar by nuclear polyhedrosis virus and insecticides and impact of treatments on the natural incidence of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Econ. Entomol.*, 74, 480-485.
- Moscardi, F., and Sosa Gomez, D. 1992. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: *Pest Management in soybean*. L.G. Copping, M.B. Green, and R.T. Rees Eds. pp. 98-109. Elsevier Applied Science, London and New York
- Moscardi, F; Morales, L and Santos B. 2002. The successful use of AgMNPV for the control of velvetbean caterpillar, *A. gemmatilis*, in soybean in Brazil. Oral Report on Symposium Virus [Prospects for the Use of Viral Pesticides] in XXXV SIP Meeting at Iguazu, Brazil, pp 86-91.
- Munoz D, Castillejo JI, Caballero P. 1998. Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population of *spodoptera exigua*. *Appl Environ Microbiol*, Nov;64:11:4372-7.
- Munoz D, Murillo R, Krell PJ, Viak JM, Caballero P. 1999. Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus Se-SP2 are distinguishable by a hypervariable genomic region. *Virus Res*, Jan;59:1:61-74.

- Murhammer, D. W. (1996). Use of viral insecticides for pest control and production in cell cultures. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 59, 199-220.
- Murillo, R. Muñoz, D. and Caballero, P. 2001. Selection of a nucleopolyhedrovirus for biological control of three *Spodoptera* species and influence of Tinopal on its activity. XXXIV Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, p. 11.
- Murray, K.D., K.S. Shields, J.P. Burand, and J.S. Elkinton. 1991. The effect of gypsy moth metamorphosis on the development of nuclear polyhedrosis virus infection. *J. Inv. Pathol.* 57: 352-361.
- O'Reilly, D. R., and Miller, L. K. 1990. Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDP glucosyl transferase gene. *Journal of Virology* 64: 1321-1324
- O'Reilly, D. R.. 1997. Auxiliary genes of baculoviruses. En: *The Baculoviruses* L.K. Miller, Ed., pp267-300. Plenum Press, New York.
- O'Reilly, D.R., Miller, L. K. 1991. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the egt gene. *Bio/Technology* 9, 1086-1089.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K. 1989. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science* 245, 1110-1112.
- Ooi BG and Miller LK 1988. Regulation of host RNA levels during baculovirus infection. *Virology* 166: 515-523.
- Ooi, B. G., Rankin, C., and Miller, L. K. 1989. Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene. *J. Mol. Biol.* 210, 721-736.
- Ooi, B.G. and Miller, L.K. 1990. Transcription of the baculovirus polyhedrin gene reduces the levels of an antisense transcripts initiated downstream. *J. Virol.* 64: 3126-3129.
- O'Reilly, D. R. & Miller, L. K. 1989. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science* 245, 1110-1112.
- O'Reilly, D. R. & Miller, L. K. 1990. Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDPglucosyltransferase gene. *Journal of Virology* 64, 1321-1328.
- O'Reilly, D. R. 1995. Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyltransferases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25, 541-550.
- O'Reilly, D. R., Brown, M. R. & Miller, L. K. 1992. Alteration of ecdysteroid metabolism due to baculovirus infection of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: host ecdysteroids are conjugated with galactose. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22, 313-323.
- O'Reilly, D. R., Howarth, O. W., Rees, H. H., & Miller, L. K. 1991. Structure of the ecdysone glucoside formed by a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Insect Biochemistry* 21, 795-801.
- O'Reilly, D.R.; Miller, L.K. and Luckow, V.A. 1992a. Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. W.H. Freeman & Co.
- Pang Y., Yu J., Wang L., Hu X., Bao W., Li G., Chen C., Han H., Hu S., Yang H. 2001 Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Virology* 287, 391-404
- Park, E. J., Yin, C. M. & Burand, J. P. 1996. Baculovirus replication alters hormone-regulated host development. *Journal of General Virology* 77, 547-554.
- Parola, A., Manzán, M. A., Lozano, M., Ghiringhelli, P., Sciocco-Cap, A and Romanowski, V. 2002. Physical and genetic map of *Epinotia aporema* granulovirus genome. *Virus Genes* 25 3, 327-339
- Pearson, M., Bjornson, R. M., Ahrens, C. H. and Rohrmann, G. F. 1993. Identification and characterization of a putative origin of DNA replication in the genome of a baculovirus pathogenic for *Orygia pseudotsugata*. *Virology* 197, 715-725.
- Pengue, W.b Commoditización y diversificación de la producción agropecuaria frente a la oferta biotecnológica argentina: ¿Dos alternativas mutuamente excluyentes? En *Transgénicos. Biotecnología en el agro*. 107-124. Editorial Universitaria de La Plata. 2000.
- Pengue, W.c. Cultivos Transgénicos ¿Hacia dónde vamos? Algunos efectos sobre el ambiente, la sociedad y la economía de la nueva "recombinación" tecnológica. Lugar Editorial. UNESCO. Programa de Ciencia y Tecnología para América Latina y el Caribe. Buenos Aires, 2000.
- Possee, R. D., Sun, T. P., Howard, S. C., Ayres, M. D., Hill-Perkins, M., and Gearing, K. L. 1991. Nucleotide sequence of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis 9.4 kbp EcoRI-I and -R polyhedrin gene region. *Virology* 185, 229-241.
- Pullen, S. S. and P. D. Friesen. 1995b. Early transcription of the ie1 transregulator gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is regulated by DNA sequences within its 5' noncoding leader region. *J. Virol.* 69:156-165.
- Pullen, S.S. and P. D. Friesen. 1995a. The CAGT motif functions as an initiator element during early transcription of the baculovirus transregulator ie-1. *J. Virol.* 69: 3575-3583
- Rapp, J. C., J. A. Wilson, and L. K. Miller. 1998. Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression. *J. Virol.* 72:10197-10206.
- Riegel, C. I., Park, E. J., Burand, J. & Slavicek, J. M. 1994. Identification and characterization of the ecdysteroid glucosyltransferase gene of LdMNPV. *Journal of General Virology* 75, 829-840
- Robinow S, Talbot WS, Hogness DS, Truman JW. 1993. Programmed cell death in the *Drosophila* CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform. *Development*, Dec;119:1251-9.
- Rodrigues, J. C., De Souza, M. L., O'Reilly, D. R., Velloso, L. M., Pinedo, F. J., Razuck, F. B., Ribeiro, B. & Ribeiro, B. M. 2001. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase egt gene of *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes* 22, 103-112.
- Roelvink PW, Corsaro BG, Granados RR. 1995. Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancer genes. *J Gen Virol Nov*;76 Pt 11:2693-705
- Rohrmann, G. F. 1992. Baculovirus structural proteins. *Journal of General Virology* 73, 749-761.
- Rohrmann, G.F. & Karplus, P. A. 2001 Relatedness of baculovirus and gypsy retrotransposon envelope proteins. *BMC Evolutionary Biology*, 1 :1.
- Romanowski V y Ghiringhelli P. D. 2001. Biología molecular de los baculovirus replicación y expresión génica. En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Caballero, P., López-Ferber, M. & Williams, T. eds., Cap 5 en pp 119-142. Phytoma S.A., Valencia, España.
- Rosinski M, Reid S, Nielsen LK., 2002. Kinetics of baculovirus replication and release using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng.* Feb 15;77:476-80
- Rost, B. & Sander, C. (1993). Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.*, 232, 584-599.
- Rubinstein R, Polson A. 1983. Midgut and viral associated proteases of *Heliothis armigera*. *Intervirology*. 191:16-25.
- Russell RL, Pearson MN, Rohrmann GF. 1991. Immunoelectron microscopic examination of *Orygia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* cells: time course and localization of major polyhedron-associated proteins. *J Gen Virol*, Feb;72 Pt 2:275-83
- Rybczynski R, Gilbert LI. 1995. Prothoracicotropic hormone-regulated expression of a hsp 70 cognate protein in the insect prothoracic gland. *Mol Cell Endocrinol*, Nov 30;115:73-85.
- Sadler, T.J., Glare, T.R., Ward, V.K., & Kalmakoff, J. 2000. Physical and genetic map of the *Wiseana* nucleopolyhedrovirus genome. *J. Gen Virol.* 81, 1127-1133.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487 de Sambrook, J., Fritsch, E.J. and Maniatis, T., 1989.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.

- Salamov, A. A. & Solovyev, V. V. (1995). Prediction of protein secondary structure by combining nearest-neighbor algorithms and multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.*, 247, 11-15.
- Sambrook, J., Fritsch, E.J. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467 de Sambrook, J., Fritsch, E.J. and Maniatis, T., 1989.
- Schwartz LM, Truman JW. 1983. Hormonal control of rates of metamorphic development in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev Biol.* Sep;99:103-14.
- Sciocco-Cap, A., Parola, A.D., Goldberg, A. L., Ghiringhelli, P.D. & Romanowski, V., 2001. Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* Wals. Lep. Tortricidae larvae, *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3702-3706, 2001.
- Slavicek, J. M., Popham, H. J. R. & Riegel, C. I. 1999. Deletion of *Lymantria dispar* multicapsid nucleopolyhedrovirus ecdysteroid UDP- glucosyl transferase gene enhances viral killing speed in the last instar of the Gypsy moth. *Biological Control* 16, 91-103.
- Smith G.E., Fraser M.J. and Summers M.D. 1983 *J.Virol.* 46, 584-593
- Smith H., Crook NE 1988. In vivo isolation of baculovirus genotypes. *Virology.* Sep;166:1:240-4.
- Smith, G.E. and Summers, M.D. 1979. Restriction Maps of five *Autographa californica* MNPV variants, *Trichoplusia ni* MNPV, and *Galleria mellonella* MNPV DNAs with endonucleases SmaI, KpnI, BamHI, SacI, XhoI, and EcoRI. *J. Virol.*30:828-838.
- Smith, I. & Goodale, C. 1998. Sequence and *in vivo* transcription of *Lacanobia oleracea* granulovirus *egt*. *Journal of General Virology* 79, 405-413.
- Smith, I.R.L., & Crook, N. E. 1988. Physical maps of the genomes four variants of *Artogeia rapae* granulosis virus. *J. Gen. Virol.* 69, 1741-1747.
- Stern, V. M., Smith, R. F., van der Bosch, R., and Hagen, K. S. 1959. The integrated control concept. *Hilgardia* 29, 81-101
- Summers MD 1971 Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. *Journal of Ultrastructural Research* 35: 606-625.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony *and Other Methods. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. employing Distance and parsimony methods.
- Taha, A. Nour-el-Din, A., Croisier, L., Lopez Ferber, M., & Croizier, G.2000. Comparative analysis of the granulin regions of the *Phthorimaea operculella* and *Spodoptera littoralis* granuloviruses. *Virus Genes.* 331, 147-155.
- Tanada Y, Leutenegger R. 1968. Histopathology of a granulosis-virus disease of the codling moth, *Carpocapsa pomonella*. *J Invertebr Pathol.* Feb;101:39-47.
- Tanada, Y and Kaya, H. 1993. DNA-viral infections: Baculoviridae. In: *Insect Pathology*. Y. Tanada and H. Kaya eds. Academic Press. p. 67-72; 171-244.
- Tapay LM, Nadala EC, Loh PC., 1999. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus. *J Virol Methods.* Sep;82:1:39-43.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876-4882.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Tjia ST, Carstens EB and Doerfler W 1979 Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. 11. The viral DNA and the kinetics of its replication. *Virology* 99: 391-409.
- Todd, J. W., Passarelli, A. L., and Miller, L. K. 1995. Eighteen baculovirus genes including *lef-77*, *p35*, *39k* and *p47* support late gene expression. *J. Virol.* 69, 968-974.
- Toister-Achituv, M. & Faktor, O. 1997. Transcriptional analysis and promoter activity of the *Spodoptera littoralis* multicapsid nucleopolyhedrovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene. *Journal of General Virology* 78, 487-491.
- Tweeten, K. A., Bulla, L. A. and Consigli, R. A. 1980. Characterization of an extremely basic protein derived from granulosis virus nucleocapsid. *Journal of Virology* 33, 866-876.
- Tweeten, K. A., L. A. Bulla, and R. A. Consigli. 1981. Applied and molecular aspects of insect granulosis viruses. *Microbiol. Rev.* 45:379-408.
- van Hulten, M.C.W., Tsai, M., Schipper, C.A., Lo, C., Kou, G. & Vlak, J. 2000. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonuclease genes and repeat regions. *J. Gen. Virol.* 81, 307-316
- Van Oers MM, Flipsen JT, Reusken CB, Sliwinsky EL, Goldbach RW, Vlak JM. 1993. Functional domains of the p10 protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol*, Apr;74 Pt 4:563-74.
- Van Oers MM, Flipsen JT, Reusken CB, Vlak JM. 1994. Specificity of baculovirus p10 functions. *Virology*, May 1;2002:513-23.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J & McCawley, P. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Lepidoptera: Noctuidae*. *In vitro* 13, 213-217.
- Villata, C.A. y Ayessa, A.M. 1994. Manejo integrado de plagas en soja. *Agro de Cuyo*, vol. 7, 71p.
- Vlak JM, Klinckenberg FA, Zaai KJ, Usmany M, Klinge-Roode EC, Geervliet JB, Roosien J, van Lent JW. 1988. Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-beta-galactosidase fusion gene. *J Gen Virol* 1988 Apr;69 Pt 4:765-76.
- Vlak, J.M and Rohrman, G.F. 1985. The nature of polyhedrin, p. 489-542. En: K. Maramorosh and Sherman, K.E. ed. *Viral insecticides for Biological control*. Academic Press, Orlando, Florida.
- Volkman LE and Goldsmith PA 1985. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology* 143: 185-195.
- Volkman LE, Zaai KJ. 1990. *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus: microtubules and replication. *Virology*, Mar;175:1:292-302
- Volkman LE. 1986. The 64K envelope protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosisvirus. *Curr Top Microbiol Immunol*;131:103-18
- Volkman, L.E., Blissard, G.W., Friesen, P., Keddie, B.A., Possee, R. & Theilmann, D. A. 1995. *Baculoviridae*. In "Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses" F.A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers, Eds, pp. 104-111. Springer-Verlag, New York.
- Volkman, LE and Knudson, DL. 1986. In vitro replication of baculovirus, p. 109-128. In: Granados R.R. and Federici B.A. *The Biology of Baculoviruses*. Vol I. Biological Properties and Molecular Biology. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Walker S, Kawanishi CY, Hamm JJ. 1982. Cellular pathology of a granulosis virus infection. *J Ultrastruct Res* 1982 Aug;80:2:163-77.
- Wang CH, Yang HN, Liu HC, Kou GH, Lo CF., 2000. Nested polymerase chain reaction and in situ hybridization for detection of nucleopolyhedrosis. *J Virol Methods.* Jan;84:1:65-75.
- Wang P, Granados RR. 1997. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Jun 24;94:13:6977-82.

- Wang X and Kelly DC 1983. Baculovirus replication: Purification and identification of the *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus-induced DNA polymerase. *Journal of General Virology* 64: 2229-2336.
- Wang, C.H., Lo, C.F., Leu, J.H., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Chou, H.Y., Tung, M.C., Chang, C.F., Su, M.S. and Kou, G.H. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome WSBV of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 23, 239-242.
- Wang, p., Granados, R.R. 1998. Observations on the presence of the peritrophic membrane in larval *Trichoplusia ni* and its role in limiting baculovirus infection. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 57-62.
- Wang, P., Hammer, D.A., Granados, R.R. 1994. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. *Journal of General Virology* 75, 1961-1967.
- Wang, S.Y., Hong, C. and Lotz, J.M. 1996. Development of a PCR procedure for the detection of *Baculovirus penaei* in shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 25, 123-131.
- Washburn, J. O., B. A. Kirkpatrick and L. E. Volkman. 1995. Comparative pathogenesis of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus in larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*. *Virology* 209: 561-568.
- Williams, G.V. and Faulkner, P. 1993. Detection of viral and cellular structures by post-embedding immunocytochemistry. In: *Immuno-gold electron microscopy in virus diagnosis and research*, edited by Hyatt, A. and Eaton, B., Boca Raton, Florida: CRC Press, .p. 177-230.
- Williams, G.V., Rohel, D.Z., Kuzio, J., and Faulkner, P. 1989. A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus AcNPV p10 gene function using insertion/deletion mutants. *J. Gen. Virol.* 70:187-202.
- Wilson ME and Consigli RA 1985a. Characterization of a protein kinase associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella*. *Virology* 143: 516-525.
- Wilson ME and Consigli RA 1985b. Functions of a protein kinase activity associated with purified capsids of the granulosis virus infecting *Plodia interpunctella*. *Virology* 143: 526-535.
- Winstanley, D. & Crook, N. E. 1993. Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures. *Journal of General Virology* 74, 1599-1609.
- Wood HA 1980. Isolation and replication of an occlusion body deficient mutant of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 105: 338-344.
- Wood, H.A. 1996. Genetically enhanced baculovirus insecticides. In: *Molecular Biology of Biological Control of Pests and Diseases of Plants*. M. Gunasekaran and D. Weber eds. CRC Press, Boca Raton. pp. 91-10
- Wormleaton, S., & Winstanley, D. 2001. Phylogenetic analysis of conserved genes within the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene region of the slow-killing *Adoxophyes orana* granulovirus. *J. Gen. Virol.* 82 :2295-2305.
- Xu, B., Yoo, S. and Guarino, L, A. 1995. Differential transcription of baculovirus late and very late promoters: Fractionation of nuclear extracts by phosphocellulose chromatography. *J. Virol.* 69, 2912-2917.
- Yan, Q., Pang, Y., Yang, J., Nong, G., Ouyang, X. & Dai X. 1999. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Spodoptera litura* multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Chinese Journal of Biotechnology* 15, 113-119.
- Yang, C.L., Stetler, D.A. and Weaver, R.F. 1991. Structural comparison of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-induced RNA polymerase and the three nuclear RNA polymerases from the host, *Spodoptera frugiperda*. *Virus Res.* 20: 251-264
- Zanotto, P. M., Kessing, B. D. & Maruniak, J. E. 1993. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *Journal of Invertebrate Pathology* 62, 147-164.
- Zeddiam JL, Pollet A, Mangoendiharjo S, Ramadhan TH, Ferber ML. 1999. Occurrence and virulence of a granulosis virus in *phthorimaea operculella* Lep., gelechiidae populations in indonesia. *J Invertebr Pathol*, Jul;74:48-54.
- Zeddiam JL, Rodriguez JL, Ravallec M, Lagnaoui A. 1999. A noda-like virus isolated from the sweetpotato pest *spodoptera eridania* Cramer Lep.; noctuidae. *J Invertebr Pathol*. Nov;74:267-74.
- Zerbino, M.S. y Alzugaray, R. 1996. *Epinotia aporema* en cultivos de leguminosas. Hoja de Divulgación No 23. INIA, Uruguay.
- Zuidema, D., Schouten, A., Usmany, M., Maule, A. J., Belsham, G. J., Roosien, J., Klinge-Roode, E. C., van Lent, J. W. & Vlak, J.M. 1990. Expression of cauliflower mosaic virus gene in insect cells using a novel polyhedrin-based baculovirus expression vector. *Journal of General Virology* 71, 2201-2209.

ANEXO I

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Las técnicas generales fueron empleadas anteriormente por los investigadores del laboratorio del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (I.B.B.M.) y otras fueron desarrolladas especialmente para este trabajo de tesis.

MATERIALES GENERALES

1. Productos químicos y enzimáticos

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron reactivos de grado analítico o de grado biología molecular suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, USA) y Carlo Erba (Milano, Italia). Las enzimas utilizadas fueron provistas por las empresas Stratagene (La Jolla, USA), Promega (Madison, USA), New England Biolabs (Beverly, USA) y Gibco BRL-Life Technologies (Grand Island, USA). Los componentes de los medios de cultivo para bacterias se adquirieron en Difco (Detroit, EE.UU.). Los medios de cultivo de células eucariotas fueron suministrados por Gibco BRL (Grand Island, USA) y los sueros fetales por Bioser (Buenos Aires, Argentina) o GEN (Buenos Aires, Argentina). Las cajas de Petri y los frascos de poliestireno, utilizados en el cultivo de células fueron provistos por Nunc (Kamstrup, Dinamarca) y Corning (USA). El agua utilizada fue destilada, desionizada y esterilizada por autoclave a 120 °C, en el laboratorio de Virus del IBBM, dado el requerimiento de una máxima calidad y pureza en los protocolos de biología molecular.

Las fotografías se obtuvieron con un equipo FOTODYNE (Polaroid) o con un equipo de Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak digital science). Para la toma de imágenes se utilizó un scanner VistaScan 240. La cuantificación de muestras se realizó por medidas de absorbancia ó con el programa Gel Compare (Applied Math).

2. Cepas bacterianas

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron bacterias de la especie *Escherichia coli* con genotipos modificados genéticamente.

DH5 α F': {endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, α lacU169 F' [f80 lacZ Δ M15]}. Hanahan (1983); BRL (1986).

Top 10: F' mcrA ((mrr-hsdRMS-mcrBC) (80lacZ (M15 (lacX74deoR recA α 1 araD139 ((ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Básicamente, ambas cepas son deficientes en recombinación y permiten que ocurra α -complementación si se utilizan vectores que codifican para la región aminoterminal de la β -galactosidasa. Poseen además el episoma F', que codifica para el pilus sexual, por lo que pueden ser infectadas por el fago M13.

3. Línea Celular de Insecto

Spodoptera frugiperda, IPLB-SF21 (SF21) (Vaughn, 1977)

4. Vectores de Clonado

Plásmido pZErOTM, (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Plásmido pcDNA II, Invitrogen (Invitrogen Carlsbad, CA)

Plásmido pBS KS+, Stratagene. (Bluescript™ KS+, Stratagene, La Jolla, CA).

Plásmidos pGEM-T y pGEM-T Easy, Promega (Promega Corp., USA).

REACTIVOS GENERALES

En todos los casos, si no se indica lo contrario, los valores de concentraciones expresadas corresponden a concentraciones finales. Para esterilizar las soluciones se la somete a filtrado (a través de filtros de 0,2 μ M) o se las autoclava (15 minutos a 121°C).

MEDIOS

1) Medios para cultivo de bacterias

Medio LB: se disuelven 5 g de NaCl, 10 g de bacto triptona y 5 g de extracto de levadura en 900 ml de agua destilada. Una vez disueltos los reactivos se ajusta el volumen a 1000 ml con agua destilada. Se esteriliza en autoclave.

Medio Terrific Broth: se disuelven 12 g de bacto triptona y 24 g de extracto de levadura en 800 ml de agua destilada, se agregan 4 ml de glicerol y luego se lleva el volumen a 900 ml con agua destilada. Se esteriliza en autoclave. Antes de usar se agregan 100 ml de una solución estéril de KH₂PO₄ (0,17M) y K₂HPO₄ (0,72M).

Para preparar medios sólidos se agregan 15 g de agar para cada 1000 ml de medio líquido.

1-1) Antibióticos para cultivo de bacterias

Ampicilina: se disuelven 100 mg en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

Kanamicina: se disuelven 500 mg en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

2) Medios para cultivo de células de insectos

TC-100 (GIBCO BRL, Gaithersburg, Md) suplementado con 10% de suero fetal bovino Bioser (Buenos Aires, Argentina), L-glutamina (Gln, 2mM) y glucosa (4,5 g/l)

Sf-900 (GIBCO BRL, Gaithersburg, Md) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser, Buenos Aires, Argentina)

2-1) Antifúngicos y Antibióticos para cultivo de células

El medio de cultivo se prepara con el agregado de anfotericina B (1,5 µg/ml) y gentamicina (50 µg/ml).

3) Medios para el desarrollo de Competencia

Medio SOB (por litro)

Extracto de levadura	5,0 g
Triptona	20,0 g
NaCl	0,5 g

Se ajusta el pH a 7,5 con KOH y se esteriliza durante 15 min a 121°C y en un autoclave. Inmediatamente antes de utilizar, se agregan 20 ml 1 M MgSO₄ esterilizado en autoclave.

SOLUCIONES

1. Soluciones para la extracción de DNA de EpapGV

Sacarosa, se usa para preparar gradientes a partir de una solución stock al 65 % P/P.

Solución de disolución de gránulos

CO ₃ Na ₂	0.10 M
EDTA	0.01 M
CINa	0.17 M

Esta solución se lleva a pH 10.5 y se conserva a 4°C en heladera

Proteinasa K se usa a concentración final 0.5 mg/ml, se prepara una solución stock de 25 mg/ml.

2. Soluciones para la extracción de plásmido

Buffer TE 1 X

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

10 % SDS

10 g de SDS en 100 ml de agua destilada. se esteriliza por autoclavado a 121°C. Se mantiene a temperatura ambiente.

Solución I

Glucosa	50 mM
Tris-HCl pH 8,0	25 mM
EDTA	10 mM

Se esteriliza por filtración. Se mantiene a 4 °C.

Solución II

NaOH	0,2 N
SDS	1 %

La solución se prepara en el momento de uso, a partir de soluciones stock de NaOH y SDS.

Solución III

AcK 5 M, pH 4,8.

La solución es 5 M con respecto al acetato y 3 M con respecto al potasio.

Preparación de RNasa libre de DNasa

La RNasa-pancreática (RNasa A), se disuelve a una concentración de 10 mg/ml en 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 15 mM NaCl. Se calienta 15 min a 100 °C y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se mantiene a -20 °C.

NaAc 3 M

Se disuelven 408,1 g de acetato de sodio en 800 ml de H₂O. Se ajusta el pH a 5,2 con ácido acético glacial, se ajusta el volumen a 1 litro y se esteriliza por autoclave.

3. Solventes Orgánicos

etanol 96 % y 70 %.

Fenol (pH 8): cloroformo: alcohol isoamílico, en proporciones 25:24:1 (V/ V).

Fenol pH 8: se funde el fenol, se le agrega hidroxiquinoleína (0,1% P/ V) y se adiciona un volumen de Tris-HCl pH 8 (0,5 M). Se agita durante 30 minutos, se estaciona hasta que se separen las fases y se elimina la fase acuosa. Este procedimiento se repite hasta que la fase fenólica alcance pH >7,8. Se agregan 0,1 volúmenes de Tris-HCl pH 8 (0,1 M) y se guarda en botella oscura a 4°C.

Cloroformo: alcohol isoamílico, en proporciones 24:1 (V/ V).

El alcohol isoamílico no es esencial y se utiliza para mejorar la separación de fases.

PEG8000 13% (P/ V) en agua bidestilada estéril. Se esteriliza por autoclave.

4. Soluciones para la extracción de RNA

1X TCG (isotiocianato de guanidinio 4M, citrato de sodio 25mM, sarkosyl 0,5% y 2-mercaptoetanol 90mM)

DNasa libre de RNasa, 5-15 U/ μ l, RQ1 DNasa (Promega Corp, USA) o similar.

Fenol (pH 5): cloroformo: alcohol isoamílico, en proporciones 25:24:1 (V/ V).

Fenol pH 5: se funde el fenol, se le agrega hidroxiquinoleína (0,1% P/ V) y se adiciona un volumen de agua bidestilada autoclavada 2 veces. Se agita durante 30 minutos, se estaciona hasta que se separen las fases y se elimina la fase acuosa. Se conserva en botella oscura a 4°C.

Cloroformo: alcohol isoamílico, en proporciones 24:1 (V/ V).

etanol 96 % y 70 %.

5. Soluciones para el análisis de ácidos nucleicos mediante electroforesis en geles de agarosa**Nativos**

Gel: agarosa 0.8 %- 1 %- 2 % ó 2,5 %. Esta solución contiene *buffer* TAE 1 X/ TBE 1X y bromuro de etidio 0,5 μ g/ μ l.

Buffer de corrida TAE 1 X

Tris-Acetato 40 mM

EDTA 1 mM

El TAE se prepara como solución concentrada **50 X**: 242 g Tris base; 57,1 ml ácido acético glacial y 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) por litro de solución.

Buffer de corrida TBE 1 X

Tris 100 mM

Ac.Bórico 90 mM

EDTA 1 mM

El TBE se prepara a partir de una solución concentrada **5 X**: 54 g de Tris base; 27,5 g de ácido bórico y 20 ml de 0,5 M EDTA pH 8,0.

A cada uno de los *bufferes* se le adicionan 20 μ l de la solución stock 20 mg/ml de bromuro de etidio.

Bromuro de etidio

Se prepara una solución concentrada hasta 20 mg / ml de bromuro de etidio en H₂O y se mantiene a temperatura ambiente protegiéndola de la luz. Esta solución se debe manejar con precaución extrema debido al alto poder mutagénico del BrEt.

Solución para siembra de muestras

TAE 1 X ó TBE 1 X, glicerol 50 %, colorantes: xylene cyanol FF, azul de bromofenol y orange-g.

6. Gel desnaturizante para RNA

Gel: agarosa 0.7-1%, 1X buffer MOPS, 0.7M formaldehído. Para preparar 100ml de esta agarosa se disuelven 0.7- 1.0 grs de agarosa en 84.0 ml de agua (libre de nucleasas). Se adicionan 10 ml de buffer 10X MOPS y 5.8 ml de formaldehído.

Buffer de corrida MOPS 1 X/ FA

MOPS	20 mM
Acetato de Sodio	5 mM
EDTA	1 mM

Cada 980 ml de buffer MOPS 1X se adicionan 20 ml de formaldehído 37% (12.3 M).

El buffer MOPS 1X se prepara a partir de una solución de MOPS 10 X: 41.2 gr de MOPS, 10.9 gr de acetato de sodio trihidrato y 3.7 gr de EDTA. Se lleva a pH 7.0 con hidróxido de sodio.

Solución para siembra de muestras

0.5X MOPS buffer, 50 % formamida, 20 mM EDTA, 2.2M formaldehído, azul de bromofenol, xylene cyanol. Previo a la siembra las muestras se calientan en el buffer de siembra, a 65°C durante 15' y se colocan en agua-hielo mientras se siembran.

7. Materiales para Hibridación**Membranas**

Hybond-N+, provista por Amersham-Pharmacia.

Zeta-probe, provista por Bio-Rad.

Radioactivos

[³²P]-H3PO₄, a partir del cuál se sintetizó el [α ³²P]-dATP. Fué suministrado por NEN (New England Nuclear, USA).

Alternativamente se usó [α ³²P]-dATP ya sintetizado que fue provisto Amersham-Pharmacia-Biotech (Piscataway, NJ, USA).

En los experimentos de determinación de actividad enzimática del producto del gen *egt*, se usó [³H]-ecdisona y En³Hancer Spray, ambos suministrados por NEN.

Soluciones para transferencia de ácidos nucleicos**Colony blot:**

- a) solución de desnaturalización: NaOH (0,5 N).
- b) solución de neutralización: Tris pH 7,5 (0,5 M).

Southern blot:

- a) solución de desnaturalización: NaCl (1,5 M), NaOH (0,5 N).
- b) solución de neutralización: NaCl (1,5 M), Tris-HCl pH 7,5 (0,5 M).
- c) solución de transferencia: SSC 10X.

Northern blot:

- a) solución de desnaturalización 1: NaCl (10 mM), NaOH (50 mM).
- b) solución de neutralización 1: *buffer* fosfato 25 mM.
- c) solución de transferencia 1: *buffer* fosfato 25 mM.
- d) solución de transferencia 2: SSC 10X.

Para prehibridación e hibridación

SSC 20X: se disuelven 175,3 gr de NaCl y 88,2 gr de citrato trisódico en 800 ml de agua. Se ajusta el pH a 7 con HCl y luego se lleva el volumen a un litro. Se esteriliza en autoclave.

SDS 10%: se disuelven 100 g en 900 ml de agua, se ajusta el pH a 7,2 con HCl y se lleva el volumen a 1000 ml. Se esteriliza en autoclave.

Denhardt 50X: (Denhardt 1966): se disuelven 5 g de Ficoll, 5 g de polivinilpirrolidona y 5 g de seroalúmina bovina en 500 ml de agua bidestilada. Se esteriliza por filtración.

DNA de espermatozoos de arenque: se disuelven 100 mg en 10 ml de agua bidestilada estéril. Luego se agrega NaCl hasta alcanzar una concentración final de 0,1 M y se extrae con fenol pH 7,8 hasta que se reduzca la interfase de proteínas desnaturalizadas. Luego se realizan extracciones con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (relaciones 25:24:1) y se recupera la fase acuosa. La fase acuosa obtenida se pasa varias veces por una aguja hipodérmica para reducir el tamaño de los fragmentos de DNA. El ácido nucleico se precipita con 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se centrifuga y el *pellet* se disuelve en agua bidestilada estéril (a concentración 10 mg/ ml). La concentración se determina por absorbancia a 260 nm. En la solución de prehibridación se usa este DNA a una concentración final de 100 µg/ ml.

Solución de trabajo para prehibridación:

SSC (6x), SDS (1%), Denhardt (5x) y RNA de levadura (2 mg/ ml) o DNA de espermatozoos de arenque (100 µg/ ml), como agente bloqueante.

8. Detección de la actividad enzimática de egt

Solución para la reacción enzimática

[³H]-ecdisona (53 Ci/mmol, 0.05 mCi/1.85 MBq, 2.0 TBq/mmol)

UDP-Glucosa 10 mM

UDP-Galactosa 10 mM

TMM 10 X (100 mM Tris-Malato, 100 mM cloruro de magnesio)

Placas de cromatografía en capa fina

Placas de TLC silica-gel 60 (25x25 cm) provistas por Merck. (Merck Comp, Alemania)

Desarrollador ó fase móvil

N-butanol:Acetona:Acido Acético gacial:Amoniaco 30%:Agua (70:50:18:1,5:60)

Dosaje del material radioactivo

Principalmente el dosaje de ³²P, se realizó por medición con un contador de centelleo líquido por efecto Cerenkov ó manualmente con un contador Geiger. Las autorradiografías se realizaron utilizando películas X-Omat™ de Kodak (Rochester, USA) o equivalente de otra marca, que se revelaron manualmente con productos químicos Kodak. Las imágenes se procesaron con ayuda del programa Kodak-Ig.

9. Geles de poliacrilamida

Geles desnaturalizantes

Gel: 6 % acrilamida-8 M urea. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (38:2) diluyendo en *buffer* TBE 1 X. Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0,1 y 0,01 %, respectivamente.

Buffer de corrida TBE 1 X

Se prepara a partir de una solución concentrada 5 X: 54 g de Tris base; 27,5 g de ácido bórico y 20 ml de 0,5 M EDTA pH 8,0.

Solución para siembra de muestras

TBE 1 X, 95 % formamida, 20 mM EDTA, azul de bromofenol, xylene cyanol.

Geles nativos de poliacrilamida

Gel: 4 % acrilamida. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (40:0,5) diluyendo en *buffer* TBE 0,25 X. Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0,1 y 0,01 %, respectivamente.

Buffer de corrida TBE 0,25 X

Se prepara a partir de una solución concentrada 5 X.

Solución para siembra de muestras

TBE 0,25 X, 50 % glicerol, 0,04 % azul de bromofenol, 0,04 % xylene cyanol.

10. Soluciones para el análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

Geles de poliacrilamida Tris-glicina-SDS

Gel separador: 18, 12, ó 10 % dependiendo del experimento. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8) diluyendo en *buffer* de separación 1 X: 0,375 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % SDS.

Gel concentrador: 5 %. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (30:0,8) diluyendo en *buffer* concentrador 1 X: 0,375 M Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % SDS.

Buffer de corrida 1 X

Tris base	25 mM
glicina pH 8,3	250 mM
SDS	0,1 %

Solución para siembra de muestras 4 X

Tris-HCl pH 6,8	250 mM
glicerol	40,0 %
SDS	8,0 %
β-mercaptoetanol	20,0 %
azul de bromofenol	0,1 %

Solución de tinción

Coomassie Brilliant Blue R-250	0,25 % p/v
metanol	45 % v/v

ácido acético 10 % v/v

Solución de destinción

etanol 30 % v/v

ácido acético 10 % v/v

11. Soluciones para tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata

Solución de fijación: ácido acético glacial 10% (V/ V) en agua bidestilada.

Solución de tinción: nitrato de plata 0,2% (P/ V) disuelto en agua bidestilada con el agregado de 250 µl de formaldehído 40%.

Solución de revelado: carbonato de sodio 3% (P/ V) disuelto en agua bidestilada con el agregado de 200 µl de formaldehído 40% y 24 µl de tiosulfato de sodio de concentración inicial 10 mg/ ml por cada 100 ml de solución.

Solución de stop: ácido acético glacial 10% (V/ V) en agua bidestilada.

12. Soluciones para ensayos de Extensión de Primer

Gel: 6 % acrilamida- 8 M urea. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (38:2) diluyendo en buffer TBE 1 X. Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0,1 y 0,01 %, respectivamente.

AcNa 3M

Fenol (pH 8): cloroformo: alcohol isoamílico, en proporciones 25:24:1 (V/ V)

Buffer de corrida TBE 1 X

Se prepara a partir de una solución concentrada 5 X: 54 g de Tris base; 27,5 g de ácido bórico y 20 ml de 0,5 M EDTA pH 8,0.

Solución para siembra de muestras

TBE 1 X, 95 % formamida, 20 mM EDTA, azul de bromofenol, xylene cyanol.

MÉTODOS GENERALES

La puesta a punto de las condiciones de empleo de las mismas se describe detalladamente en la sección que precede a los resultados de cada capítulo. Los reactivos empleados, salvo que se indique lo contrario, se expresan como concentraciones finales.

I) Extracción de ácidos nucleicos

I.1) Minipreparación de DNA plasmídico

I.1.A) Método de lisis alcalina (Birnboim and Doly, 1979)

Este método se utiliza para separar el DNA plasmídico de los componentes macromoleculares bacterianos (incluyendo el DNA cromosomal). Las condiciones de alta alcalinidad (pH 12 a 12,6) causan la desnaturalización del DNA cromosómico de la bacteria sin afectar al DNA plasmídico debido a que este último es circular y covalentemente cerrado. En el paso de la neutralización con una solución rica en sales (solución III) se produce la precipitación de los ácidos nucleicos bacterianos, en la presencia de un detergente aniónico (SDS) que provoca la precipitación de las proteínas.

La purificación se realiza a partir de un cultivo bacteriano saturado en medio LB con ampicilina. Para ello se centrifuga (a máxima velocidad en microcentrífuga durante 1 minuto) una alícuota de un ml cultivo. Este procedimiento se repite tres veces. Posteriormente se resuspende el *pellet* obtenido en 200 μ l de solución I, se agregan 300 μ l de solución II (fresca) y se incuba en agua-hielo durante 5 minutos. Luego se neutraliza el pH por el agregado de 300 μ l de solución III y se incuba durante el mismo tiempo en agua-hielo. El DNA cromosómico, los restos celulares y las proteínas complejadas con el SDS se eliminan por centrifugación a máxima velocidad durante 15 minutos. Se toma el sobrenadante, que se extrae con un volumen de fenol pH 8.0/ cloroformo/ isoamilico (25:24:1) para eliminar proteínas, y se precipita el DNA plasmídico presente en la fase acuosa por el agregado un volumen de isopropanol. Se centrifuga 20 minutos a máxima velocidad y el *pellet* resultante se lava con etanol 70%, se seca en microcentrífuga de vacío y se resuspende en un volumen adecuado de agua bidestilada estéril. Suele resuspenderse en 20-30 μ l y agregarse 1 μ l de RNasa 20 mg/ml para eliminar el RNA.

I.1.B) Método de lisis alcalina / precipitación con PEG (*Applied Biosystems*)

Las preparaciones de DNA plasmídico para secuenciación automática (utilizando el secuenciador modelo 373A de *Applied Biosystems*) se realizaron de acuerdo al método de lisis alcalina y precipitación con PEG descrito en el manual de instrucciones del equipo. Este método es semejante al de *Birnboim & Doly*, (*Birnboim and Doly, 1979*) pero tiene algunas modificaciones.

Para obtener un mayor número de bacterias se las cultiva en medio *Terrific Broth*, que es un medio más nutritivo que el LB. Al sobrenadante obtenido tras precipitar el DNA cromosomal se le agrega RNasa A para eliminar el RNA bacteriano que interfiere en las reacciones de secuenciación. Una vez cumplida la etapa de incubación 37°C, la enzima se extrae con medio volumen de cloroformo/ alcohol isoamilico (este procedimiento se repite dos veces). El DNA de la fase acuosa se precipita un volumen de isopropanol 100 % y se centrifuga. El *pellet* que se obtiene se lava con etanol 70 %, se seca en microcentrífuga de vacío y se resuspende en agua bidestilada estéril. Se realiza una segunda precipitación del DNA plasmídico con NaCl (400 mM) y PEG8000 (6,5%). Tras incubar en hielo durante 20 minutos, se somete a centrifugación en frío a máxima velocidad (30 minutos) y el precipitado resultante se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en agua bidestilada estéril.

I.2) Extracción de ácidos nucleicos de Baculovirus

I.2.A) Extracción de Viriones de EpapGV

Para realizar la extracción se tomaron larvas de *Epinotia aporema* en último estadio y se las infectó con EpapGV. La dosis de virus y el tiempo de procesamiento post infección que se usó fue diferente según el objetivo de cada extracción. Para obtener DNA de viriones se procedió primeramente a triturar las larvas muertas en buffer TE, se filtró el homogenato por gasa, para separar cutícula y restos mayores de insectos. Luego se separaron los gránulos virales de los restos menores por medio de múltiples centrifugaciones diferenciales. Alternativamente, según las necesidades de pureza de gránulos que se requiera, en esta etapa se puede realizar una purificación por gradiente continuo de sacarosa 25%-65%. Luego los gránulos se "disolvieron" en una solución de Carbonato de sodio 0.1M, pH 10.5 / EDTA 0.01M / ClNa 0.17M durante 30 minutos a 37°C. Este clarificado se neutralizó a pH 7 y se ultracentrifugó en rotor SW 41 Ti a 100000g durante 60 minutos para poder sedimentar los viriones. De esta manera los viriones quedan listos para ser usados en las siguientes etapas. Después de la disolución alcalina de los gránulos, todos los pasos se realizan en frío.

Para obtener RNA, las larvas se procesan vivas en solución de tiocianato de guanidinio, se las aplasta hasta observar la destrucción total de los tejidos, se centrifugan para separar restos mayores y luego se procede con el sobrenadante según el método de extracción de RNA de Chomczynski y Sacchi (1987)

I.2.B) Extracción de DNA viral

Para extraer DNA viral se trató los viriones durante 90 minutos con Proteinasa K (Cf: 0.5mg/ml). Luego se realizó una extracción con un volumen de fenol, luego fenol-cloroformo-isoamilico y finalmente cloroformo-isoamilico. El sobrenadante, conteniendo el DNA, se precipitó con AcNa 0.3M y un volumen de isopropanol. El DNA se resuspendió suavemente en agua o TE a 60°C, tomando precaución al disolverlo para evitar el nickeado del mismo. La cuantificación del DNA se realizó por medidas de absorbancia a 260/280 de longitud de onda.

I.2.C) Extracción de RNA total del insecto y virus.

La extracción de RNA total a partir de insectos se realizó por el método de Chomczynski y Sacchi (1987). Para esto se tomó un determinado número de larvas (5-6 larvas), infectadas a alta dosis viral y se procesaron hasta las 84 hs post-infección. Las larvas se trituraron en 300 μ l de 1xTCG (isotiocianato de guanidinio 4M, citrato de sodio 25mM, sarkosyl 0,5% y 2-mercaptoetanol 90mM). Sobre esta suspensión se realizaron dos extracciones: con fenol ácido (pH 4) y con cloroformo:isoamilico (24:1), en ese orden. El RNA total se obtuvo de la fase acuosa por precipitación en presencia de NaAc 0,3 M y 2,5 vols. de etanol. El *pellet* de RNA se resuspendió en agua y se guardó a -70 °C. La estimación de la pureza y cantidad del RNA se realizó por medidas de absorbancia a 260nm y 280 nm de longitud de onda o por observación visual en gel de agarosa.

El RNA fue analizado por electroforesis en geles de agarosa desnaturizante, 1%, en presencia de MOPS/formaldehído. Posteriormente, el gel fue transferido por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham-Pharmacia) para detectar específicamente RNA virales por hibridación con sondas radioactivas (*Northern blot*).

II) Electroforesis (Sambrook et al., 1989)

La técnicas de electroforesis permiten separar a los ácidos nucleicos según su peso molecular. La fricción que soportan las moléculas en su migración a través de la trama del gel es proporcional a su tamaño, por lo tanto, las moléculas pequeñas migran a mayor velocidad que las grandes. Los ácidos nucleicos, cargados negativamente, migran desde el polo negativo al positivo en una cuba de electroforesis. La electroforesis se realiza a 120V durante 30 minutos en el *buffer* que corresponda. Las bandas presentes en el gel se visualizan por tinción con bromuro de etidio, autorradiografía o con nitrato de plata, dependiendo de la naturaleza del gel.

II.1) Electroforesis en geles de agarosa (Sambrook et al., 1989)

La agarosa es un polímero lineal extraído de un alga que se disuelve en el *buffer* de electroforesis. Cuanto mayor es la concentración de la agarosa menor es el poro de la matriz. Los fragmentos de gran tamaño se resuelven en geles con poro de mayor tamaño mientras que para resolver fragmentos pequeños se emplean geles de poros pequeños. A la preparación de agarosa se le agrega bromuro de etidio (0,5 µg/ ml), un colorante fluorescente que contiene un grupo planar que se intercala entre las bases del DNA. Cuando se irradia con luz ultravioleta de 320 y 366 nm, la molécula se excita y emite energía a 590 nm lo cual permite la visualización de los ácidos nucleicos. Este colorante puede utilizarse tanto para detectar RNA como DNA en cadena simple o doble.

En el caso de utilizar la electroforesis en gel para verificar integridad y tamaño de sondas marcadas con [$\alpha^{32}\text{P}$] dATP, luego de la resolución los ácidos nucleicos se fijan en la matriz del gel con ácido tricloroacético al 10%. Luego, el gel se seca y se expone sobre película radiográfica con pantalla amplificadora a -70°C, el tiempo necesario.

II.2) Electroforesis en geles de poliacrilamida

La acrilamida es un monómero que, en presencia de radicales libres (provistos por el persulfato de amonio) y de un agente estabilizante de los mismos (N,N,N',N'-tetrametiletilen-diamina, TEMED), se polimeriza formando largas cadenas lineales. Cuando se incorpora el agente bifuncional N,N'-metilenbisacrilamida se forman entrecruzamientos entre los polímeros lineales.

II.2.A) geles desnaturalizantes

Estos geles se polimerizan en presencia de un agente desnaturalizante (urea o formamida) que suprime el apareamiento entre las bases de los ácidos nucleicos. En este caso la migración de las moléculas sólo depende del tamaño y no de la composición en bases, secuencia o estructura.

Para el análisis de productos de secuencia se utilizan geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6% (a partir de una solución *stock* 38:2), *buffer* TBE 1x, TEMED y persulfato de amonio con una concentración final de urea 7 molar.

Para el análisis de los productos generados por: *primer extension*, transcripción *run-off* y los resultantes de los ensayos de protección a RNasas se utilizan geles desnaturalizantes de poliacrilamida 4% (a partir de una solución *stock* 38:2), *buffer* TBE 1x, TEMED y persulfato de amonio con una concentración final de urea 7 molar.

La electroforesis se realiza a 120V durante 30 minutos en *buffer* TBE 1x. Las bandas presentes en el gel se visualizan por tinción con nitrato de plata o autorradiografía.

II.2.B) Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata

El gel se agita en solución de fijación durante un tiempo mínimo de 30 minutos. Posteriormente se realizan tres lavados de 2 minutos cada uno con agua bidestilada. Luego se agrega la solución de tinción (preparada fresca) y se incuba durante 30 minutos con agitación. Tras un lavado con agua bidestilada de no más de 30 segundos se incuba durante 30 minutos con solución de revelado. La reacción se detiene por el agregado de solución de *stop*. Los geles se conservan en esta solución en heladera hasta su secado.

III) Purificación de ácidos nucleicos

III.1) Purificación de DNA

III.1.A) Purificación de DNA a partir de geles de agarosa (GENECLEAN II BIO 101, Inc. Vista CA)

Este método permite purificar el DNA a partir de la matriz de agarosa. La sección del gel que contiene el DNA se disuelve con NaI. Una vez disuelta la agarosa se agrega polvo de vidrio (*glass milk*), se mezcla y se incuba en hielo durante 15 minutos para favorecer la unión del DNA. La suspensión se centrifuga y se lava tres veces con *New Wash* (NaCl, etanol y agua). El *pellet* de polvo de vidrio se seca bien para eliminar los restos de alcohol y se le agrega agua bidestilada estéril. Por medio de una incubación de 5 minutos a 50°C, seguida de centrifugación, se libera el DNA adherido al polvo de vidrio. El sobrenadante contiene el DNA de interés en solución.

III.1.B) Precipitación de productos de PCR con PEG6000

La precipitación con PEG6000 en presencia de sales permite separar los productos generados por PCR de los *primers* y nucleótidos no incorporados en la reacción.

Para purificar los productos se agregan 0,6 volúmenes de PEG6000 20% (P/ V)/ NaCl 2,5M y se realizan incubaciones de 10 y 30 minutos a 37°C y 4°C respectivamente. A continuación se centrifuga y el *pellet* resultante se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en un volumen adecuado de agua bidestilada estéril.

III.2) Purificación de RNA

La purificación se puede realizar tanto luego de resolver los productos en un gel de agarosa como directamente a partir de la solución de síntesis. Cuando se generan transcritos marcados por el método de transcripción *run-off* es necesario separarlos del nucleótido no incorporado.

III.2.A) Purificación de RNA partir de geles de agarosa (RNAid, BIO 101, Inc. Vista CA)

Los transcritos se resuelven en un gel de agarosa 0,8%-TAE 1x. El gel se expone a placas autorradiográficas que, una vez reveladas, permiten determinar la región donde se encuentra la sonda. Se corta esta zona y se le agregan 0,3 volúmenes de una solución salina (*RNA binding salt*). Se incuba a 50°C el tiempo necesario para disolver la agarosa y se agrega 1 µl de una matriz

de unión de RNA (*RNAid matrix*) por cada μg de RNA. Se incuba 5 minutos y luego se centrifuga durante 1 minuto a máxima velocidad. El *pellet* se lava tres veces con solución de lavado (*RNA wash solution*), se agregan 20 μl de agua bidestilada estéril y se incuba durante 5 minutos a 50°C para despegar el RNA de la matriz. Se centrifuga 5 minutos a máxima velocidad y se toma el sobrenadante.

III.2.B) Purificación de RNA partir de solución (RNAid, BIO 101, Inc. Vista CA)

Los transcritos no se resuelven en gel de agarosa sino que a la mezcla de transcripción *in vitro* se le agregan directamente tres volúmenes de solución salina (*RNA binding salt*) y 2 μl de matriz de unión de RNA. El resto del procedimiento es similar a lo anteriormente descrito.

III.2.C) Precipitación de RNA con acetato de amonio

Tras la digestión del DNA molde de la transcripción con DNasa RQ 1 se extrae dicha enzima con fenol:cloroformo:isoamílico. El RNA presente en la fase acuosa se precipita con 0,2 volúmenes de acetato de amonio 5 M (concentración inicial) y 2,5 volúmenes de etanol frío. Se incuba 1 hora a -80°C y se centrifuga a velocidad máxima durante 1 hora a 4°C. El *pellet* obtenido se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en agua bidestilada estéril.

III.2.D) Precipitación de RNA con tRNA de levadura

Los productos de los ensayos de *primer extension* y protección a RNasas se precipitan en presencia de un RNA portador (*carrier*). La inclusión de tRNA de levadura permite precipitar cantidades muy pequeñas de ácido nucleico. Se agregan 4 μg de este *carrier* y 2,5 volúmenes de etanol absoluto a cada tubo del experimento, se incuba durante 1 hora a -20°C y se centrifuga a velocidad máxima a 4°C durante 1 hora. El *pellet* obtenido se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en un volumen adecuado de *buffer* de siembra.

IV) Amplificación y análisis de ácidos nucleicos

IV.1) Reacción de PCR (Saiki et al., 1988)

Esta técnica permite amplificar un DNA molde cientos a miles de veces a partir de cantidades ínfimas de dicho material. Como se utilizan polimerasas termoestables, cada ciclo, que incluye las etapas de desnaturalización, *annealing* y extensión puede repetirse varias veces produciéndose, en cada uno de ellos, un incremento exponencial de la molécula deseada. Además, como la reacción se realiza con *primers* de secuencia específica se acota la longitud del producto de acuerdo a lo deseado.

Las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador *Idaho* (1605 Air ThermoCycler) así como también en los cicladores *Gene Amp PCR System 2400* (PERKIN ELMER) y *Eppendorf*. En el primero de los casos la transferencia de calor se produce en una cámara de aire que rodea a las muestras cargadas en capilares de vidrio. En el ciclador PERKIN ELMER y EPPENDORF la transferencia de calor se realiza a través de la base donde se colocan los tubos en los que se lleva a cabo la reacción, la tapa de este equipo también está termostatzada. Los tubos utilizados en las reacciones son de tipo *Eppendorf* pero de 0,2 ml de capacidad con lo cual no es necesario agregar aceite mineral a la muestra para prevenir la evaporación. Se utilizan los siguientes reactivos: *buffer* de DNA polimerasa (1x); dNTP's (0,25 mM de cada uno); MgCl_2 (2 mM); *primers* directo y reverso (0,5 mM cada uno) y *Taq* DNA polimerasa (0,25 U). En las reacciones que se realizan el ciclador *Idaho* se agrega seroalbúmina bovina (BSA) no acetilada (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para evitar la desnaturalización de la polimerasa en la superficie del capilar.

IV.1.A) Amplificación de genes.

Las reacciones se realizan en cualquiera de los dos cicladores térmicos mencionados ajustando las condiciones de ciclado según cual sea el aparato utilizado. Los programas de ciclado varían en cuanto a temperatura y duración de la etapa de *annealing*, duración de los tiempos de extensión y número de ciclos según los oligonucleótidos utilizados y el tamaño del fragmento a amplificar. Como molde para las reacciones se utiliza una alícuota del producto generado en la reacción de cDNA, o cualquier otro molde que interese amplificar, lo suficientemente diluidos como para evitar amplificaciones inespecíficas.

IV.1.B) Análisis de colonias que portan plásmidos recombinantes

Para determinar la presencia y el tamaño de los insertos que portan los plásmidos, se utiliza la presencia de secuencias complementarias a los *primers* -20 directo y -24 reverso del fago M13 y a los *primers* correspondientes a las secuencias promotoras para las RNA polimerasas de T7 y SP6, en los vectores de clonado utilizados. El análisis se realiza a partir de material de colonia o de estría. Una pequeña cantidad de material bacteriano se deposita en la pared de un tubo *Eppendorf* o similar, se resuspende en agua bidestilada estéril, se somete a hervor en baño María y se centrifuga a máxima velocidad durante 10 minutos. Una alícuota del sobrenadante se utiliza como molde en las reacciones de PCR. El análisis de colonias empleando *primers* de secuencia específica se realiza de la misma manera. Las concentraciones de los reactivos son idénticas a las descritas en la sección anterior y las condiciones de ciclado se ponen a punto para cada producto.

IV.2) Obtención de cDNA

Las DNA polimerasas termoestables que se utilizan en las reacciones de PCR son enzimas que utilizan DNA como molde de síntesis. Por ende, cuando el material de partida para la amplificación es RNA, es necesario realizar primero una reacción de transcripción reversa para generar moléculas de cDNA que se utilizan como molde en las reacciones siguientes.

En el caso el RNA se desnaturaliza por calor en presencia de el o los *primer/s* de interés. Tras enfriar en hielo se incorpora hidróxido de metilmercurio (2,4 mM) para mantener a las dos hebras en estado monocatenario y se incuba diez minutos a temperatura ambiente. Luego se agrega β -mercaptoetanol (34 mM), *buffer* de AMV (1x), dNTP's (0,2 mM de cada uno), 7,2 U de RNAsin y 5 U de transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV). La mezcla se homogeniza y se incuba a 42°C durante dos horas. El producto generado en la reacción de transcripción reversa se utiliza posteriormente como molde en las reacciones de PCR.

IV.3) Digestión con enzimas de restricción

Las endonucleasas de restricción reconocen secuencias específicas en el DNA, y en las condiciones descritas por la empresa que provee la enzima, producen cortes en el mismo.

Para realizar las reacciones de digestión se ajustan las condiciones de acuerdo a lo especificado por los proveedores. La cantidad de enzima que se incluye depende de la cantidad de DNA a digerir, de acuerdo a la definición de unidad enzimática (cantidad de enzima necesaria para digerir totalmente 1 μg de DNA en un volumen de reacción de 50 μl , en una hora, en las condiciones de temperatura y *buffer* adecuadas). Las reacciones se incuban en presencia del *buffer* correspondiente (1x), a la

temperatura óptima y durante el tiempo indicado. Cuando se digieren grandes cantidades de DNA se considera la sobrevida de las enzimas para reducir la cantidad de unidades, extendiendo el tiempo de incubación. Por análisis en gel, con los correspondientes marcadores de peso molecular y controles sin digerir se controla si la digestión fue completa.

IV.4) Reacciones de ligación (Sambrook *et al.*, 1989)

Se llevan a cabo para unir un fragmento de DNA foráneo de interés a un vector adecuado. En los casos en que se ligan insertos con extremos extendidos o productos generados por PCR se usa una relación de tres moléculas de inserto por cada molécula de vector. En aquellos casos donde se ligan moléculas con extremos romos (*blunt*) la relación molar inserto a vector es de 5:1 a 10:1. En las reacciones se utilizan entre 0,5 y 1,5 unidades de T4 DNA ligasa y el *buffer* correspondiente a concentración final 1x. Cuando se llevan a cabo ligaciones en *blunt* se agrega PEG8000 (a concentración final 10%) para incrementar la eficiencia del proceso.

V) Preparación de bacterias competentes

V.1) Preparación de bacterias competentes por el método químico (Hanahan, 1983)

Para transformar químicamente bacterias de la especie *E. coli* es necesario procesarlas para obtener un estado de competencia que les permita adquirir DNA foráneo del medio circundante. La preparación de bacterias competentes se realizó de acuerdo al método de Hanahan. (1983)

Se cultiva la cepa de interés (DH5 α F') ó TOP 10 de *Escherichia coli* durante toda la noche con agitación y a 37°C en medio Psi B. Posteriormente, se diluye 1/100 en el mismo medio y se cultiva hasta lograr una DO500 entre 0,8 y 1,0 (fase logarítmica tardía). Posteriormente, las bacterias se incuban en hielo, se centrifugan y se resuspenden sucesivamente en solución TFB I y TFB II. Las bacterias se incuban nuevamente en agua-hielo y luego se fraccionan y congelan, conservándose a -70°C hasta su utilización.

V.2) Preparación de bacterias para electroporación (Slivinski, 1990)

En el caso de las bacterias que se utilizan para electrottransformación no es necesario producir alteraciones en la pared por métodos químicos para inducir la competencia sino que, simplemente, las bacterias se lavan con glicerol 10% para eliminar todas las sales que podrían interferir en la conducción del impulso eléctrico.

A partir de un cultivo saturado se realiza una dilución 1/100 en medio LB sin NaCl y se cultivan a 37°C con agitación vigorosa hasta alcanzar una OD de 0,5 a 600 nm. Posteriormente las bacterias se centrifugan y se resuspenden en glicerol 10% (V/V). El proceso de resuspensión y centrifugación se repite tres veces disminuyendo el volumen de glicerol utilizado en los lavados. Por último las bacterias se resuspenden en un volumen adecuado (2 ml para un cultivo inicial de 1000 ml) de glicerol 10% y se congelan rápidamente. Se las conserva a -135°C hasta el momento de utilizarlas.

VI) Métodos de transformación bacteriana

VI.1) Transformación por *shock* térmico (Sambrook *et al.*, 1989)

Las bacterias competentes obtenidas por el método químico y el producto de ligación se mezclan y se incuban durante 30 minutos en agua-hielo. Luego se produce un *shock* térmico de no más de 2 minutos a 42°C y se incuban nuevamente en agua-hielo (durante 10 minutos). Tras este tratamiento las bacterias se incuban a 37°C una hora en medio LB sin antibiótico y se siembran en placas de LB/ agar con ampicilina.

VI.2) Transformación por electroporación

Las bacterias se someten a un campo eléctrico que crea poros transitorios en su pared. Este hecho permite el ingreso de material externo.

La mezcla de las bacterias descongeladas y de la alícuota de la reacción de ligación se realiza en hielo. Posteriormente la misma se coloca en una cubeta de electroporación fría, que se ubica en el electroporador. Se determinan las condiciones de capacitancia y campo eléctrico y se realiza la electroporación. Las bacterias se resuspenden en medio LB sin antibiótico y se incuban a 37°C durante 1 hora y luego se siembran en placas de LB/ agar con ampicilina.

Como se utilizan vectores de clonado plásmidos con capacidad de α -complementación, las bacterias transformadas, tanto por *shock* térmico como por electroporación, se seleccionan por la ausencia de color cuando se plaquean en cajas de LB con el antibiótico que corresponda y con IPTG y X-Gal. Esto no es necesario cuando el vector utilizado es pZerOTM.

VII) Síntesis de los nucleótidos radioactivos

La síntesis de nucleótidos radioactivos se realizó de acuerdo a la modificación (Ghiringhelli *et al.*, 1985) del método original de Walseth y Johnson (1979). El [32P]-H₃PO₄ constituye el sustrato para la síntesis de [α 32P]-ATP, el cual a su vez, es el sustrato para la síntesis de [α 32P]-ATP y [α 32P]-dATP. La síntesis de estos últimos se realizó en paralelo, a través de un conjunto de reacciones muy similares.

La primer etapa consistió en la síntesis de [γ 32P]-ATP, a partir de [32P]-H₃PO₄ y ADP. La reacción está catalizada por un conjunto de enzimas (glicerofosfato deshidrogenasa, triosafofosato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, 3-fosfoglicerato quinasa y lactato deshidrogenasa), en presencia de piruvato y cisteína.

En la etapa siguiente el grupo fosfato radioactivo del [α 32P]-ATP se transfirió a una molécula de 3' AMP, para formar 3',5' [α 32P]-ADP; en una reacción catalizada por la enzima polinucleótido quinasa. En una reacción paralela, se usó el precursor 3' dAMP para formar 3',5' [α 32P]-dADP. En las etapas siguientes se detallan los productos de la síntesis del [α 32P]-ATP, ya que los obtenidos en la síntesis de [α 32P]-dATP son análogos.

Posteriormente, se utilizó la nucleasa P1 para hidrolizar específicamente el fosfato 3', no radioactivo, del ADP y obtener 5' [32P]- AMP. El pH utilizado en esta etapa es crítico, ya que la nucleasa P1 posee su actividad máxima a diferentes pHs, si en la reacción se utilizan ribonucleótidos (pH 7 a 9) o deoxiribonucleótidos (pH 4,5 a 6).

La última etapa consistió en la fosforilación del 5' [32P]-AMP para rendir [α 32P]-ATP. Esta reacción está catalizada por las enzimas piruvato quinasa y mioquinasa y se realizó en presencia de fosfoenolpiruvato, que representa la molécula dadora de fosfatos.

El rendimiento de cada una de las etapas se analizó por medio de una cromatografía en papel de PEI-celulosa, utilizando ácido fosfórico 0,33M como fase móvil. En general, el rendimiento total de la síntesis varió entre 70 y 90 % según la fuente del 32P y el tipo de nucleótido sintetizado.

Cuando se usó radiactivo sintetizado de origen comercial, el mismo se agregó directamente a la reacción.

VII) Marcación de ácidos nucleicos por métodos radiactivos (Sambrook et al., 1989).

VII.1) Generación de sondas de DNA por *random-priming*

La técnica de *random priming* permite la generación de fragmentos marcados de longitud parcial utilizando un ácido nucleico como molde de la reacción y una mezcla de *primers* de longitud determinada (6 u 8 bases) y secuencia al azar como iniciadores de la reacción.

El DNA molde se libera por digestión de minipreparaciones de DNA plásmidico o se genera por amplificación por PCR. En ambos casos se purifica a partir de geles de agarosa por *gene clean*. Se usan entre 100 y 200 ng de DNA molde, una mezcla de dNTPs sin dATP (0,5 mM), *primers* pdN6 (de seis nucleótidos) (0,5 mM), *buffer* de Klenow (1x), fragmento Klenow de la DNA polimerasa (5 U) y 40 μ Ci de 5' [α 32P] dATP (3000 μ Ci/mmol). La mezcla se incuba a 37°C durante 2 horas y media. Una vez concluida la reacción, la sonda se separa de *primers* y nucleótidos no incorporados por pasaje por columna de Sephadex G-50 (que retiene fragmentos de DNA menores de 20 pares de bases).

VII.2) Generación de sondas de cDNA por *random-priming*

Cuando el molde es RNA se usa transcriptasa reversa para sintetizar fragmentos de cDNA marcado. La mezcla de molde y *primers* (pdN6) se somete a ebullición, se enfría en agua-hielo y se le agrega inhibidor de RNAsas (RNasin, 50 U). Se incuba 7 minutos a temperatura ambiente y se incorporan: *buffer* de AMV (1x); espermidina (0,5 mM); DTT (10 mM); dNTPs sin dATP (1 mM); 5' [α 32P] dATP (50 μ Ci) y la transcriptasa reversa AMV (11,5 U). Posteriormente se incuba a 42°C durante dos horas y los fragmentos resultantes se purifican por pasaje a través de una columna de Sephadex G-50.

VII.3) Generación de sondas por PCR

Esta técnica permite la síntesis de sondas de longitud total empleando los *primers* de interés.

Las condiciones de reacción y los reactivos que se usan son iguales a los de una reacción de PCR convencional, con la excepción de la concentración de los dNTPs. Se utiliza una mezcla donde la concentración de dATP (0,02 mM final) es diez veces menor que la de los demás nucleótidos y se agregan 10 μ Ci de 5' [α 32P] dATP (3000 μ Ci/mmol) por reacción. Las sondas obtenidas se purifican por pasaje por una columna de Sephadex G-50. La integridad y el tamaño de las mismas se verifican por separación en gel de agarosa 0,8%.

VII.4) Síntesis de RNAs marcados por *run-off transcription* (Sambrook et al., 1989)

La presencia de los promotores para las RNA polimerasas DNA dependientes de los fagos SP6 y T7 en la secuencia flanqueante al *polylinker* en los vectores de clonado utilizados permite realizar la síntesis de transcritos *in vitro*. Estas RNA polimerasas tienen alta afinidad y especificidad por sus promotores por lo que se las usa para generar transcritos *in vitro* de la polaridad deseada. Debido a su alta procesividad es necesario linearizar el DNA plasmidico utilizado como molde por digestión con una enzima de restricción adecuada para generar transcritos que terminen uniformemente en la posición deseada (*run-off*).

Los plásmidos se linealizan por digestión con las enzimas de restricción adecuadas, que posteriormente se extraen con fenol:cloroformo:isoamílico. El DNA molde se precipita con acetato de sodio (0,3 M) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Se centrifuga y el *pellet* obtenido se seca y disuelve en agua bidestilada estéril. Una alícuota equivalente a 100 ng se utiliza como molde en la reacción de transcripción. La misma se realiza en presencia de *buffer* de la RNA polimerasa (1x), DTT (10 mM), RNasin (15 U), T7 RNA polimerasa (15 U), una mezcla de rNTPs fríos (a concentración final 500 μ M de cada uno con excepción del rATP que se encuentra a 50 μ M) y 50 μ Ci de 5' [α 32P]rATP. La reacción se incuba una hora a 37°C. El mismo protocolo se emplea para la síntesis de los transcritos fríos, con la salvedad que la concentración final de los cuatro rNTPs es la misma (500 μ M).

Para los ensayos de protección a RNAsas el DNA molde se elimina por una incubación de diez minutos a 37°C con 0,8 U de DNasa RQ1. La enzima se extrae con fenol:cloroformo:isoamílico y los transcritos marcados, libres de DNA, se purifican por precipitación con acetato de amonio o por unión a una matriz (*RNAid kit* BIO101, Inc. Vista CA).

VII.5) *Fill in* de extremos 5' extendidos utilizando el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa (Sambrook et al., 1989)

Esta técnica permite incorporar nucleótidos a fragmentos de restricción que poseen extremos 5' extendidos. Se emplea para agregar un nucleótido marcado para disponer de marcadores de peso molecular en electroforesis para verificación de integridad y de tamaño de sondas de DNA y en ensayos de *Southern blot*.

Para llevar a cabo la reacción se utilizan entre 1 y 4 μ g de DNA digeridos con una enzima que deje extremos apropiados, 20 μ Ci de [α 32P] dATP (3000 μ Ci/ mmol), una mezcla de dNTPs sin dATP (0,25 mM), 1 a 4 U del fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa y el *buffer* de la enzima (1x). La mezcla se homogeneiza por agitación y se incuba a 30°C durante 15 min. La reacción se detiene agregando EDTA pH 8 a concentración 20 mM final.

VIII) Hibridación de ácidos nucleicos (Sambrook et al., 1989)

Las sondas marcadas radiactivamente se usan para detectar secuencias específicas en ácidos nucleicos transferidos a una membrana o para realizar ensayos de hibridación en solución.

Para todos los ensayos de hibridación en membrana se realiza primero una incubación de 1 hora con solución de prehibridación a la temperatura adecuada, con el fin de bloquear todas las regiones donde no se transfirió ácido nucleico y minimizar la posibilidad de pegado inespecífico de la sonda a la membrana. Luego se agrega la sonda previamente desnaturalizada por calor y se incuba a la misma temperatura durante 14 horas. Tras la hibridación las membranas se lavan con

soluciones que contienen 0,1% de SDS y concentraciones decrecientes de SSC para eliminar las hibridaciones inespecíficas y sonda que no hibridó. Los filtros se exponen a placas radiográficas y los resultados de la hibridación se observan por revelado de las mismas.

VIII.1) Análisis de colonias Transformantes por *Colony-Blot*

El uso de esta técnica permite analizar simultáneamente un gran número de colonias e identificar aquellas que portan plásmidos recombinantes con los insertos de interés.

En una primera etapa, a partir de las colonias seleccionadas por color, se realizan estrias, por duplicado, las que una vez crecidas se transfieren a un filtro de papel *Wathman* 541. La lisis de las bacterias se realiza sobre este filtro, por incubación con solución de desnaturalización, luego se neutraliza el pH (con solución de neutralización). Por medio de una doble incubación con SSC 2x se alcanza la condición salina adecuada para la precipitación del DNA plasmídico que se realiza por incubación con etanol 96%. Todas las incubaciones son dobles y tienen una duración de 5 minutos cada una. Una vez cumplidas estas etapas, el filtro se seca y se guarda hasta el momento de realizar la hibridación.

VIII.2) *Southern blot* (Sambrook et al., 1989).

Esta metodología permite localizar, por hibridación, las secuencias de interés en una membrana a la que se transfirió el DNA en estudio.

El DNA de interés se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos resultantes se resuelven en geles de agarosa. Para realizar la transferencia se produce primero una desnaturalización en gel, por incubación del mismo durante treinta minutos a temperatura ambiente en solución de desnaturalización; esta incubación se realiza dos veces. Posteriormente, se neutraliza el pH por incubación durante treinta minutos con solución de neutralización (doble incubación). El gel se lava con agua destilada estéril, se equilibra con *buffer* de transferencia durante dos minutos y las muestras se transfieren por capilaridad a durante 16 horas a una membrana *Zeta-Probe* (BIO-RAD) o *Hybond-N+* (Amersham-Pharmacia) equilibradas con SSC 2x. Tras la transferencia, los ácidos nucleicos se fijan a la membrana por exposición a luz ultravioleta de 320 nm durante cinco minutos.

VIII.3) *northern blot* (Sambrook et al., 1989).

En esta técnica el RNA se transfiere a membrana y las secuencias de interés se detectan por hibridación con una sonda de RNA o DNA marcado.

Para lograr una correcta separación de los ssRNAs se hacen las electroforesis en geles desnaturalizantes agarosa/MOPS/formaldehído, 1% con o sin bromuro de etidio.

Las membranas de elección son las mismas que en el caso anterior. Las soluciones de transferencia que se pueden utilizar son SSC 10X o *buffer* fosfatos. El RNA se fija a la membrana por luz UV.

VIII.4) *dot blot* (Sambrook et al., 1989).

Se aplican los ácidos nucleicos desnaturalizados a una membrana *Zeta-Probe* (BIO-RAD). Para ello se utiliza un equipo de filtración que permite obtener puntos (*dots*) homogéneos y acelera el pasaje de los ácidos nucleicos a la membrana por medio de la aplicación de vacío.

Al molde se le agrega un volumen de formamida desionizada, en el caso de que el molde sea RNA o si es DNA se le agrega 0.5M de NaOH. Se someten a ebullición a baño María durante 2 minutos, se coloca inmediatamente en agua-hielo y se incuba hasta el momento de la siembra. El molde se fija a la membrana, previamente equilibrada con agua bidestilada estéril, por medio de la aplicación de vacío. Luego de la transferencia, los ácidos nucleicos se fijan por calor (80°C) durante 2 horas o por irradiación con luz UV durante 5 minutos.

IX) Secuenciación (Sanger et al., 1977).

Para la secuenciación se utilizó el método de Sanger. En este método la DNA polimerasa sintetiza hebras complementarias al DNA molde a partir de un *primer* iniciador. En la mezcla de reacción se incluyen dideoxinucleótidos (ddNTPs), que una vez incorporados a una hebra de DNA detienen su síntesis (la polimerasa necesita un OH en la posición 3'). Se generan cadenas que son de distinta longitud. Estos productos se resuelven en geles desnaturalizantes de poliácridamida que permiten la separación de hebras de ssDNA que difieran en un nucleótido.

IX.1) Secuenciación Automática (Sanger et al., 1977).

En las reacciones de *secuenciación automática* se incorporan ddNTPs marcados con fluoróforos y se realiza una amplificación lineal del producto por medio de un programa de ciclado y el uso de una DNA polimerasa termoestable. Los productos se analizan en un secuenciador automático (*Applied Biosystems Model 373A DNA Sequencing System*). Como *primers* de las reacciones se usan los oligonucleótidos directo y reverso de M13 (-20 directo y -24 reverso), los correspondientes a las secuencias promotoras de los fagos T7 y SP6 o de secuencia específica diseñados para tal fin. Los moldes de la reacción pueden ser DNA plasmídico (350 ng de un plásmido recombinante de hasta 4 kpb) o productos de PCR (30 ng de un producto de un tamaño aproximado de 400 pb, previamente precipitado con PEG6000). En caso de que los moldes sean de un tamaño mayor al citado es necesario ajustar la cantidad de moléculas incrementando la masa. Tras el ciclado la muestras se purifican por pasaje a través de una columna de exclusión molecular, se secan, se desnaturalizan por calor en presencia de formamida desionizada y se resuelven en un gel desnaturalizante de poliácridamida 6% (solución stock 19:1), 7M urea.

IX.2) Secuenciación Manual

En el procedimiento de secuenciación manual los plásmidos fueron desnaturalizados, previamente, en presencia de NaOH 0,4M y purificados por cromatografía en columna en la resina de exclusión molecular Sepharosa CL-4B (Miniprep Spun Column, Pharmacia, Suecia).

Las secuencias nucleotídicas se determinaron por el método de terminación de cadenas (Sanger et al., 1977), usando una forma modificada de la DNA polimerasa del fago T7 (Sequenase™, USB, Cleveland, USA). En el caso de la secuenciación de los fragmentos de DNA clonado, se utilizaron los primers "universales" directo y reverso complementarios al sitio de clonado múltiple de los plásmidos pUC, en otros casos se utilizaron primers específicos.

IX.3). Reacciones de secuencia con ciclado térmico

Alternativamente, las secuencias nucleotídicas se determinaron por el método de terminación de cadenas en una reacción de ciclado, en presencia de *Taq DNA pol* (fmol™ DNA Sequencing System, Promega, USA). Esta reacción fue utilizada sobre moldes de DNA plasmídico, aislados por el procedimiento de *minipreps* y purificados por precipitación en presencia de PEG8000 (5%) y NaCl (0,5M). Además, este procedimiento fue utilizado para determinar la secuencia nucleotídica de fragmentos de cDNA amplificados por PCR, analizados por electroforesis en geles de agarosa y purificados por el método de adsorción y elución con polvo de vidrio (Geneclean, Bio101, La Jolla, USA).

X) Cultivo de células

Las células Sf-21 fueron cultivadas en el medio TC-100 (Gibco) suplementado con L-glutamina (Gln, 2mM), glucosa (4,5 g/l) y suero bovino fetal (SBF, 10%). El medio de cultivo se preparó con el agregado de anfotericina B (1,5 µg/ml) y gentamicina (50 µg/ml).

Los repiques celulares se realizaron por desprendimiento de las células y pasaje a nuevos frascos (o cajas) usando diferentes diluciones. Brevemente, las células se lavaron con TC-100 fresco. Luego de este tratamiento por 1 minuto aproximadamente, se agregó el volumen necesario de medio de cultivo para realizar el pasaje a los nuevos frascos o cajas.

XI) Estudio Transcripcional del gen de *egt*

Para completar el estudio molecular del gen *egt* fue necesario realizar el estudio transcripcional del mismo. Esto consiste en la determinación de los extremos no codificantes, 5' y 3', por una o más de las técnicas descriptas en los manuales de métodos de Biología Molecular.

XI.1) RACE

Esta técnica permite conocer el tamaño y la secuencia exacta de cada extremo no codificante, para realizar el ensayo se extrae RNA de larvas infectadas y no infectadas; se diseñan primers *ad hoc* para cada uno de los extremos y se sintetizan los correspondientes cDNAs, luego se sintetizan los cDNAs doble cadena, amplifican, clonan y secuencian.

XI.2) Ensayo de Extensión de primer (*Primer Extension*)

Esta técnica permite conocer el tamaño exacto de la región 5' no codificante. Para el ensayo se sintetiza, a partir de RNA y con un *primer anti-sense*, una cadena marcada radioactivamente de cDNA que luego se resuelve en un gel de poliácridamida desnaturante al lado de una secuencia que sirve de marcador de peso molecular. La reacción de síntesis de esta cadena es la misma que en la síntesis de cDNA pero con el agregado de radioactivo. Luego se realiza una precipitación con agregado de AcNa 3M y PAL 2.5 mg/ml que elimina los nucleótidos no incorporados. Se lava con alcohol 70% frío, se seca y se resuspende en *buffer* de siembra. El resultado se resuelve en un gel de poliácridamida desnaturante.

XII) Estudio de Expresión del gen *egt*

Con el objetivo de disponer un sistema con el cual se pudiera estudiar el nivel de expresión y la actividad del gen *egt* se diseñó un ensayo de expresión transiente a partir del cual se logró obtener cantidad suficiente de esta enzima como para concretar estos estudios. Para realizar la expresión del gen *egt*, se utilizó una línea celular susceptible y un vector de expresión que se generó en el laboratorio a partir del plásmido pBS KS+. Para detectar la actividad enzimática se utilizó sustrato marcado radioactivamente.

XII.1) Transfección

El vector de transfección se generó a partir del plásmido pBS KS+ (Bluescript™ KS+, Stratagene, La Jolla, CA) al cual se le agregó el promotor inducible de *Drosophila melanogaster*, *hsp-70*, en los sitios *Xba* I-*Eco* R I. A este plásmido luego se le añadió el marco de lectura abierto completo del gen *egt*, con extremos *Eco* R I y *Kpn* I que facilitaron la unión y orientación del ORF en sentido correcto para su posterior expresión. El promotor *hsp-70* se obtuvo por digestión del plásmido pAcDZ1 con las enzimas *Xba* I-*Eco* R I (Zuidema *et al.*, 1990).

El plásmido final generado que se utilizó en la transfección fue llamado: **pBS-hsp70-egt**.

La línea celular susceptible elegida fue la de *Spodoptera frugiperda*, Sf-21, que se propagó y mantuvo en medio TC-100, suplementada con 10% suero fetal bovino.

Las células Sf-21 se transfectaron e incubaron a 28°C durante 48 hs, se lavaron con medio fresco, se complementaron con 1ml de medio y se procedió a la inducción por shock térmico a 42°C durante treinta minutos, luego se incubaron nuevamente a 28°C durante 2 hs.

XII.2) Detección de la actividad de la enzima, *egt*

Una alícuota del sobrenadante del paso anterior se utilizó para determinar la actividad de la enzima expresada, *egt*.

Para ello utilizamos como sustratos ecdisona marcada con [³H] y [UDP]-glucosa y [UDP]-galactosa simultáneamente y/o alternativamente.

Se incubaron todos los reactivos a 37°C durante 2hs y luego se realizó una cromatografía en capa fina que permitió separar el sustrato glicosilado del que no lo está, confirmandose de esta manera la actividad enzimática.

XII.3) Determinación de la actividad de *egt* en larvas de *E. aporema*

Con el fin de detectar actividad enzimática de *egt* en larvas se procedió a repetir el procedimiento explicado anteriormente (sobre alícuotas extraídas de larvas).

Para extraer la alícuota se trabajó con insectos que se criaron en condiciones controladas de temperatura (25 °C) y humedad relativa (50%). Las larvas fueron alimentadas con dieta artificial (Green *et al.*, 1976, modificada) en recipientes plásticos de 1 litro de capacidad. Los adultos fueron manejados en jaulas de oviposición con suplemento de miel al 10% como sustrato de alimentación y un fotoperíodo de 14:10 horas L:O.

Los insectos se disgregaron en *buffer* TE y una alícuota se utilizó en el ensayo de actividad enzimática como se ha descrito previamente.

XIII) Programas utilizados en el análisis de secuencias nucleotídicas

El análisis y comparación de las secuencias generadas se realizó con una computadora Sun UltraSparc II utilizando lenguaje Unix (solaris 2.7). Se utilizaron una serie de programas incluidos en el paquete Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin, EE.UU.

XIII.1) Programas para edición de secuencias

Assemble: para construir secuencias nuevas a partir de secuencias preexistentes. Construye una secuencia nueva uniendo las especificadas y genera un nuevo archivo con la construcción.

Pretty: para ver alineamientos múltiples generados previamente por otro programa. Calcula la secuencia consenso del alineamiento.

SeqEd: para ingresar y modificar secuencias, también permite ensamblar secuencias preexistentes. Además, se pueden introducir secuencias a partir del teclado.

XIII.2) Programas para comparación de secuencias

XIII.2.A) Programas para comparar secuencias de a pares

BestFit: para crear un alineamiento óptimo del segmento de mayor similitud entre dos secuencias. Los alineamientos se generan insertando gaps para maximizar el número de coincidencias utilizando el algoritmo de Smith y Waterman.

Gap: para encontrar el mejor alineamiento global entre dos secuencias, maximizando el número de coincidencias (matches) y minimizando el número de espacios (gaps). Este programa utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch.

XIII.2.B) Programas para comparar múltiples secuencias

PileUp: para generar alineamientos múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos progresivos de a pares.

XIII.3) Programas para búsquedas en bases de datos

Fetch: para copiar secuencias de GCG o traerlas desde bases de datos hacia el directorio personal.

XIII.4) Programas para importar y exportar secuencias

ChopUp: para convertir una secuencia de formato diferente al GCG de una longitud de hasta 32000 caracteres a un archivo nuevo que contiene líneas de no más de 50 caracteres. Posteriormente es necesario aplicar el programa reformat.

Reformat: para convertir archivos de secuencias, de matrices de valores (scoring matrix) o de datos de enzimas a formato GCG.

FromFastA: para convertir secuencias de formato FastA a formato GCG.

ToFastA: para convertir secuencias de formato GCG a formato FastA.

XIII.5) Programas para realizar mapeo de secuencias

Map: para realizar mapas teóricos de restricción de secuencias nucleotídicas. Permite ver ambas hebras del DNA con los puntos de corte de las enzimas de restricción seleccionadas y, además, ofrece la posibilidad de generar las secuencias aminoácidas deducidas de los seis marcos posibles. También se pueden producir mapas de secuencias aminoácidas.

XIII.6) Programas para diseñar primers

Prime: para diseñar primers tanto para amplificar por PCR como para secuenciar un determinado fragmento de DNA. Permite el diseño de primers individuales o de pares de los mismos. Para una determinada aplicación se usó en el laboratorio el programa de diseño de primers (Ghiringhelli *et al*, resultados no publicados).

XIII.7) Programas para obtener secuencias aminoácidas deducidas

Reverse: para 'invertir' una secuencia de DNA (de 3'→5' a 5'→3') o para generar de la secuencia inversa la complementaria.

Translate: para generar una secuencia aminoácida deducida a partir de una secuencia nucleotídica.

XIV) Análisis filogenético

El análisis filogenético utilizando el enfoque cladista, fue elaborado usando diferentes rutinas del conjunto de programas PHYLIP (Phylogeny Inferencing Package, Version 3.5) sobre los alineamientos de secuencias, en una computadora personal. El muestreo sobre los alineamientos de secuencias se realizó por el método de *bootstrapping* con el programa SEQBOOT, durante 100 a 1000 ciclos consecutivos. El análisis de parsimonia sobre los alineamientos de secuencias de aminoácidos, se realizó con el programa PROTPARS. Alternativamente, estos alineamientos se analizaron con el programa de construcción de matrices de distancias, PROTDIST, de acuerdo a la tabla de similitudes de aminoácidos de Dayhoff-PAM. A partir del alineamiento de la secuencia nucleotídica se construyó una matriz de distancias con el programa DNADIST, calculadas de acuerdo al modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura. El análisis de parsimonia sobre las matrices de distancia y la generación de los cladogramas correspondientes fue realizado con los programas FITCH y NEIGHBOR. En todos los casos el árbol de consenso se obtuvo por la regla de la mayoría con el programa CONSENSE.